



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

El comportamiento del meristemo apical de la raíz de Arabidopsis thaliana en mutantes de pérdida y ganancia de función de AGAMOUS-LIKE2 (XAANTAL1).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

Iván Ransom Rodríguez



DIRECTOR DE TESIS:

Biól. Mario Alberto Pacheco Escobedo
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Ransom
Rodríguez
Iván
55-54-51-75
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
408015190

2. Datos del tutor

Biólogo
Mario Alberto
Pacheco
Escobedo

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Adriana
Garay
Arrollo

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Joseph
Dubrovsky

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Aurora
Zlotnik
Espinosa

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Fabiola
Jaimes
Miranda

7. Datos del trabajo escrito

Análisis celular dinámico del meristemo de la raíz de Arabidopsis thaliana en mutantes de pérdida y ganancia de función de AGAMOUS-Like12 (XANTAAL1). 53 páginas. 2013.



FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

El comportamiento del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en mutantes de pérdida y ganancia de función de AGAMOUS-LIKE12 (XAANTAL1).

realizado por **Ransom Rodríguez Iván** con número de cuenta 4-0801519-0 quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr. Joseph Dubrovsky	
Propietario	Dra. Adriana Garay Arroyo	
Propietario Tutor	Biól. Mario Alberto Pacheco Escobedo	
Suplente	Dra. Aurora Zlotnik Espinosa	
Suplente	Dra. Fabiola Jaimes Miranda	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D. F., a 09 mayo de 2013
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.
MAG/mdm

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ecología de la UNAM, especialmente al laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas y al Taller de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de las Plantas por permitirme usar las instalaciones y material necesarios para la elaboración de esta tesis.

A mis sinodales: Biól Mario Alberto Pacheco Escobero, Dra. Adriana Garay Arroyo, Dr. Joseph Dubrovsky, Dra. Aurora Zlotnik Espinosa, y Dra. Fabiola Jaimes Miranda, por su amable disposición y tiempo invertido en revisar este trabajo, por sus comentarios, sugerencias y correcciones gracias a las cuáles la calidad de este trabajo incrementó considerablemente.

A Karla Verónica García Cruz, por proporcionarme la línea de sobreexpresión *35S::XALI*, la cual fue imprescindible para la realización de éste trabajo. A Francisco Guijarro Higuera por su disposición y tiempo invertido en editar la Figura 4.

A los siguientes proyectos: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); IN204011-3; IN203113-3; IN226510-3; IB201212-2), y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT); 180098; 180380; 167705; 152649; 105678.

Agradecimientos y Dedicatorias.

A Dios, por haberme dado la oportunidad de nacer y desarrollarme en el entorno en el que crecí; por enseñarme, aunque haya sido de la manera más difícil, que el que las cosas no sucedan como uno lo planea puede ser lo mejor; y por haberme ayudado a mantenerme íntegro y fiel a mi moral y mis ideales.

A mis padres, por haberme dado la vida y habernos convertido, a mí y a mis hermanos, en el centro de la suya. Por haberme educado no sólo en cuestiones académicas, sino morales y espirituales. Por haberme enseñado lo que es amar desinteresadamente y que en el sacrificio de uno mismo por los demás se encuentra la más grande muestra de amor. Por estar ahí para mí cada vez que los he necesitado y de la manera que las circunstancias lo ameritaban, ya fuese con dulzura o dureza, pero siempre con paciencia y sincera preocupación. Por motivarme a seguir, aún cuando las circunstancias fuesen tan difíciles, por no perder la esperanza en mí aún cuando yo mismo ya la había perdido. No sólo les dedico éste trabajo a ustedes, también les dedicaré cada logro y alegría de mi vida, pues sin ustedes yo no sería lo que soy...aún siendo consciente de que, por más que haga, nunca podré compensar todo lo que han hecho por mí, jamás dejaré de intentarlo. Los amo.

A mis hermanos, Erick, Adrián y Andrea, y Carlos Díaz García, por haber compartido su vida conmigo haciendo de mi infancia la mejor que pudiese imaginar. Por estar siempre tan cercanos a mí y haberme acompañado al crecer, por todas las veces en que jugamos y también por aquellas en las que peleamos. Con ustedes aprendí a relacionarme con las demás personas y a perdonar. Al tenerlos a mi lado aprendí a trabajar en equipo y a meter las manos al fuego por otra persona...ustedes serán mis eternos cómplices.

A mis tíos y primos, ya los viese mucho o poco siempre podía sentir esos lazos tan estrechos que nos unen. Gracias por apoyarme siempre, compartir su valiosa vida y sus experiencias conmigo...sepan que estaré ahí para ustedes de la misma manera. Agradezco especialmente a mi tío

Manolo, a quien admiro como a pocas personas y quien me ha inspirado a buscar entender la verdad tanto por el camino espiritual como por el científico, y a mis abuelos y Tilu...quienes siempre estarán en mi corazón.

A mis otros hermanos, la familia que he elegido tener. Schober, La Raza, Misael, Joaquín, Luis, Juan Francisco, Fau\$\$sto, Juan, Pepe y Diego. Por haber compartido su vida conmigo, por haber estado a mi lado todo este tiempo, y me alegra el tener la certeza de que será así hasta el último de nuestros días. Gracias por todas las tardes de juegos, noches de desvelos, por todas las risas y anécdotas compartidas. Por todos estos años de amistad y los que faltan. Por mucho tiempo me han dado fuerza y me han ayudado a afrontar las distintas pruebas a lo largo de mi vida. Gracias por estar ahí de manera incondicional para mí.

A las niñas más especiales en mi vida. Flor, Demetra, Rin, Nina, Kora, Laurita, Clau, Wendy, Ivonne, Marlene, Fabiola, Fany (te adoro TuT), Lina, Karla, Mabel, Pafy y Jimena. Gracias por mostrarme lo hermoso del mundo, por hacerme ver que aún quedan personas con un hermoso corazón. Ustedes me hacen pensar que en el mundo aún hay algo por lo que luchar, algo que vale la pena proteger, ustedes me dan esperanza. Y a Alicia, por haberme mostrado ese sueño que, aún cuando terminó, sus recuerdos quedarán grabados en mi corazón para siempre...gracias por haberme mostrado el verdadero significado de la felicidad, gracias por todo.

A todos mis profesores a lo largo de mi preparación académica, especialmente a José Ángel Flores, Román Espinosa y Alfonso Vilchis. Gracias por haber sido los pilares de mi preparación hasta antes de entrar al Taller. Ustedes, cada uno en distintas etapas de mi vida, quienes me proveyeron además de conocimiento, del gusto por aprender y de hacer uso de la creatividad para resolver problemas. También a todos mis compañeros y amigos desde la primaria hasta el fin de la carrera, especialmente a Alán, Noé, Coral, David, Isaí, Maviael, Eunice, Brenda, Luis, Mariel, Yesenia, Aura, Mir, Andrea, Dafne, Olivia, Loray, Hanen e Ixchel. Gracias por haber compartido tanto conmigo. Además de haber tenido la oportunidad de haber formado parte de un equipo de trabajo con

ustedes, de haber compartido clases o pruebas difíciles...tuve el gusto de conocerlos como personas, de hablar con ustedes en el salón de clases, en los pasillos o escaleras de la Facultad, de aprender no sólo de sus conocimientos, sino de sus experiencias de vida...guardo un aprecio muy grande por todos ustedes y me alegra mucho el haberlos conocido.

A todas las personas que tuve el gusto de conocer en el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de las Plantas. A la Dra. Elena Álvarez-Buylla, por darme un lugar en su laboratorio y ser un gran ejemplo de compromiso y sincera preocupación por sus colegas y estudiantes. A la Dra. Adriana Garay, por tu paciencia, amabilidad, atenciones y disposición para apoyarme...aprendí mucho de tí y he disfrutado mucho trabajar en colaboración contigo. A la Dra. María de la Paz Sánchez, Dra. Berenice García, M. en C. Rigoberto Pérez y Diana Romo por sus atenciones y amable disposición. A Andrea SanJuan y Aurora Gamez, por haberse preocupado por mí y haberme apoyado en todo momento tanto académica como moralmente, por resolver mis dudas y aportar tanto a mi desarrollo dentro del laboratorio. A Juan Manuel Estévez, Julio Flores, Alma Piñeyro, Yamel Ugartechea, Paola Rojas, David Cruz, Karla García y a mis compañeros, Karla, Víctor, Minely, Joel, Estephania, Emiliano, Stefan, Alejandra, Emilio y Duhyadi.

Agradezco especialmente a mi tutor de tesis, Biól. Mario Alberto Pacheco Escobedo, por haber sido quien me guió en el camino de la investigación científica, llevando a mis ojos la luz del entendimiento en un entorno desconocido para mí, cual Virgilio hizo con Dante. Gracias por haberme enseñado tanto, por la paciencia y auténtico interés en que aprendiera; por haber celebrado conmigo mis triunfos (e incluso hacerme ver el valor de aquellos que yo no consideraba como tales) y por haberme apoyado en mis fracasos; por darme los ánimos para seguir esforzándome y confiar en mi capacidad para llevar un trabajo adelante; por haberte preocupado por mí bienestar físico y moral, y por compartir conmigo tu experiencia, conocimientos, tiempo, alegrías, dificultades. Eres una persona muy completa, instruido en la música, los idiomas, las artes marciales, la literatura y la ciencia, por todo lo anterior no sólo te guardo una gran estima, sino también una gran admiración.

Gracias por haberme mostrado las técnicas de laboratorio y las herramientas conceptuales necesarias para llevar a cabo éste trabajo.

Agradezco al Dr. Joseph Dubrovsky, por su apoyo, amabilidad y por haberme enseñado tanto. Me ayudó mucho a desarrollar mi capacidad crítica y a ver con mayor profundidad los fenómenos fisiológicos y celulares que inciden en el desarrollo de la raíz.

A mi archienemigo Alfonso Carbajal Domínguez, jajaja, he esperado tanto para hacer este agradecimiento...ojalá te mueras xD. Gracias por haber estado a mi lado desde que entré a la Facultad, por haber confiado en mí, por haber sido la persona que más me alegraba encontrar ahí, por haberme hecho reír tantas veces, por contagiarme tu buena vibra y por haber hecho de mi estancia en la Facultad algo muy especial y sobre todo por ser un verdadero amigo (mío no, pero supongo que lo haz de ser de alguien). Cuando no estábamos juntos en las clases podía tomarlas muy tranquilo, pero siempre que estabas tú me divertía demasiado. Fuimos un buen equipo en la clase de Física (y la mascota esta de testigo), en la de Genética (ya sabes lo que espera el profesor) y en la de Paleobiología. Pasan los días y por más que Yersinia y yo deseemos que te mueras aún no pasa...pero no te confíes, en cualquier momento podemos cumplir nuestra amenaza. Me da mucho gusto que te estés aplicando en la maestría, espero que te vaya mal, repruebas y te mueras xD. Nan-kurunaisa.

A mis compatriotas, aquellos que están vivos y aquellos que ya no, pues el que la UNAM haya sido construida y siga siendo una realidad es gracias a ustedes. Compensaré por todo lo que me ha sido dado, luchando por las personas de bien y aquellas cuyas circunstancias no les permiten mejorar su realidad. Me esforzaré cada día para que el mundo sea un mejor lugar para todos.

A Dios, alfa y omega...por haberme permitido conocer a tantas personas tan maravillosas, vivir experiencias tan especiales y haberme dado la oportunidad de forjar mi propio futuro.

“No llores por un mundo que lucha, lucha por un mundo que llora”.

Tabla de contenido

1. LISTA DE ABREVIACIONES	9
2. INTRODUCCIÓN	9
<u>2.1</u> Organización de la raíz.....	12
2.2 El crecimiento de la raíz.....	12
2.3 El tamaño del meristemo.....	13
2.4 Tamaño celular crítico.....	15
<u>2.5</u> MADS-box y <i>XAANTAL 1 (XAL1)</i> o <i>AGAMOUS-Like 12 (AGL12)</i>	16
<u>3.</u> JUSTIFICACIÓN	20
<u>4.</u> OBJETIVO.....	21
<u>5.</u> HIPÓTESIS.....	22
<u>6.</u> MATERIALES Y MÉTODOS	23
<u>6.1</u> Material vegetal.....	23
<u>6.2</u> Condiciones de crecimiento	23
<u>6.3</u> Microscopia.....	23
<u>6.4</u> Medición de las células de córtex en la raíz.....	24
<u>6.5</u> Determinación de la Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo (<i>LCELM</i>).....	24
<u>6.6</u> Delimitación de las zonas de la raíz.....	24
6.7 Análisis estadístico.....	24
<u>7.</u> RESULTADOS.....	25
7.1 Delimitación del meristemo	25
7.2 Parámetros celulares en el meristemo	27
7.2.1 Parámetros celulares en el meristemo concernientes al l_{crit}	30
7.2.2 Tamaño del meristemo.....	32
<u>8.</u> DISCUSIÓN	35
8.1 Parámetros celulares en el meristemo concernientes al l_{crit}	35
<u>8.2</u> Tamaño del meristemo	37
<u>9.</u> CONCLUSIONES	39
<u>10.</u> REFERENCIAS	40
<u>11.</u> APÉNDICE.....	45

1. LISTA DE ABREVIACIONES

Centro Quiescente (*CQ*).

Dominio de Proliferación Celular (*DPC*).

Dominio de Transición (*DT*).

Días Posteriores a la Germinación (*dpg*).

Días Posteriores a la Siembra (*dps*).

Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo (*LCELM*)

Longitud de las Células Previa a la Mitosis (l_{mit}).

Media de la Longitud de una Célula en Interfase (l_{int}).

Tamaño Crítico (l_{crit}).

tipo silvestre (*WT*).

XAANTAL 1 (*XALI*).

Zona de Alargamiento (*ZA*).

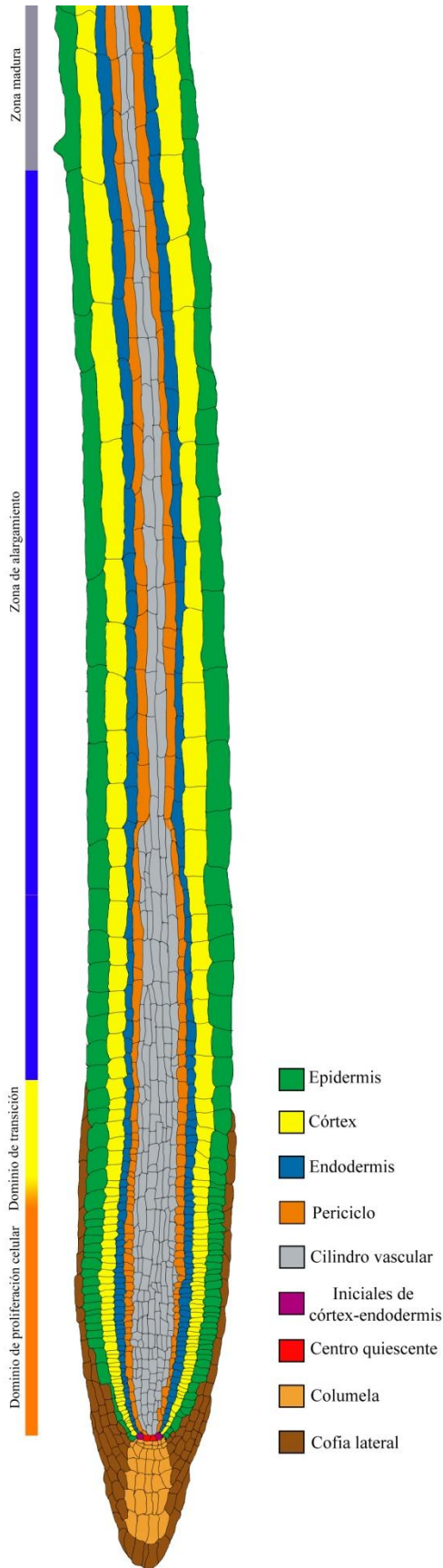
Zona de Proliferación (*ZP*).

2. INTRODUCCIÓN

Arabidopsis thaliana se ha convertido en organismo modelo para el estudio de numerosos aspectos de la biología vegetal por diversas características, como lo son la gran cantidad de semillas que produce, un ciclo de vida corto, su tamaño relativamente pequeño, la totalidad de su genoma secuenciado, la posibilidad de cultivar las plántulas *in vitro* y el hecho de que existen colecciones de líneas mutantes para una gran cantidad de *loci*. La raíz también se ha utilizado para entender las relaciones entre dinámicas celulares de proliferación y especificación del tipo celular durante la morfogénesis de un órgano complejo *in vivo* (Sabatini *et al.*, 2003; Wildwater *et al.*, 2005; Caro *et al.*, 2007; Tapia-López *et al.*, 2008). La raíz de *A. thaliana* ha resultado útil como sistema modelo para estudios de desarrollo debido a su estructura relativamente simple, su simetría radial y su organización linear (Dolan *et al.*, 1993; Benfey y Schiefelbein, 1994; Malamy y Benfey, 1997; Baskin, 2000; Tapia-López *et al.*, 2008). Ya que presenta características útiles que incluyen la relativa facilidad para aclarar las raíces y la naturaleza de su crecimiento, que es continuo y más bien uniforme, sin ninguna transición mayor de desarrollo (Benfey y Schiefelbein, 1994). Finalmente, la raíz de *Arabidopsis* presenta un patrón de zonación longitudinal a diferencia del meristemo aéreo, en el que no hay una separación entre la zona donde ocurre proliferación y la zona de alargamiento (Ivanov, 1981).

2.1 Organización de la raíz

Para propósitos descriptivos, Benfey y Schiefelbein (1994) han dividido longitudinalmente a la raíz de *A. thaliana* en tres zonas: el meristemo, que incluye el nicho de células troncales, este último formado por el centro quiescente (*CQ*) y las células troncales funcionales (células iniciales) que lo rodean y la zona de proliferación (*ZP*), la zona de alargamiento (*ZA*), en la que las células ya no se dividen y se alargan rápidamente; y la zona madura (*ZM*), en la que las células han adquirido sus atributos totalmente diferenciados; en esta última zona no existen ni divisiones ni crecimiento celular en la mayoría de los tejidos (Fig. 1). En un corte transversal de la raíz se puede observar un cilindro central diarco, cuya capa más externa es el periciclo y fuera de esta capa se encuentra la endodermis, que se encuentra rodeada por el córtex y éste a su vez por la epidermis (Dolan *et al.*, 1993).



Ivanov y Dubrovsky, (2012) han dividido al meristemo en dominio de proliferación celular (DPC), donde existe una alta probabilidad de que las células se dividan mitóticamente; y en dominio de transición (DT), en el que aún se pueden dividir las células pero la probabilidad de que esto suceda es muy baja (ver Fig. 1). El meristemo apical de la raíz es un complejo de tejidos, y el producto de su actividad mitótica da origen a los tejidos organizados que conforman la raíz madura y funcional, y debido a que está constituido por una gran cantidad de células proliferativas es especialmente útil para investigaciones sobre producción celular (Webster y MacLeod, 1980).

El CQ es un grupo de células cuya actividad mitótica se mantiene reprimida la mayor parte del tiempo y cuya división, a lo menos comprobado para otras especies, da origen a los cuatro tipos de células iniciales de la columela y a las células iniciales de epidermis/cofia lateral, córtex/endodermis y cilindro vascular (Webster y MacLeod, 1980; Baskin, 2000). El CQ constituye una población de células troncales que está carac-

Figura 1. Corte longitudinal del meristemo, ZA y zona de diferenciación de la raíz de *A. thaliana* a 7 días post siembra, donde se distinguen sus nueve tipos celulares, así como su patrón de zonación.

terizada una baja actividad proliferativa y un ciclo celular más largo respecto a las células proliferativas (Webster y Mac-Leod, 1980; Baskin, 2000; Shishkova *et al.*, 2008).

Las raíces han sido clasificadas en cuatro tipos: primaria, lateral, adventicia y basal, dependiendo de dónde y cuándo se originaron en el transcurso del desarrollo de la planta (Webster y MacLeod, 1980). Para fines del presente trabajo sólo se abordará el primer tipo. La raíz primaria se deriva directamente de la raíz embrionaria o radícula y su desarrollo se divide en: maduración, que es la etapa en la que se establece la raíz a partir de un primordio (Webster y MacLeod, 1980); y germinación (definida por Evert, 2008, como la reanudación del crecimiento del embrión en la semilla), la cual cubre el desarrollo después de la dormancia y da lugar al establecimiento del meristemo en estado estable (Webster y MacLeod, 1980), es decir, cuando la tasa de proliferación y diferenciación han llegado a un equilibrio. El tamaño de la raíz se determina contando el número de células corticales desde el *CQ* hasta el pelo radicular más proximal (Willemsen *et al.*, 1998).

2.2 El crecimiento de la raíz

El crecimiento de la raíz depende de dos factores, la tasa de producción celular (P) del meristemo, que es el número de células producidas por unidad de tiempo, y la tasa de alargamiento de las células, que se refiere al incremento en la longitud celular por unidad de tiempo, en la *ZA* (Beemster y Baskin; 1998). Si bien tanto la tasa de producción celular como la tasa de alargamiento son importantes para determinar la tasa de crecimiento de la raíz, es a este último proceso al que se debe el mayor aporte de este crecimiento (Ivanov, 1994; Beemster y Baskin, 1998; Baskin, 2000). La tasa de crecimiento de la raíz después de la germinación es relativamente baja, pero se incrementa conforme aumenta el número de células en el meristemo y por lo tanto, su tasa de producción celular, y aquellas que ya están en la zona de diferenciación¹.

Para que el meristemo pueda mantener su tamaño constante, la tasa de producción celular debe ser igual a la tasa de tránsito de las células a la parte no meristemática de la raíz. Dentro del meristemo, será en el *DPC* en donde se produzcan las células que, debido

¹ La tasa de producción celular (P) es directamente proporcional al número de células proliferativas en el meristemo e inversamente proporcional a la duración del ciclo celular.

al desplazamiento respecto al *CQ* como consecuencia del crecimiento celular relativamente lento y de las citocinesis (definida por Campbell *et al.*, 2009, como la división del citoplasma para formar dos células hijas) sucesivas de las células más distales entrarán al *DT* y posteriormente a la *ZA*, donde las células salen del ciclo mitótico (Ivanov y Dubrovsky, 2012). Las células en la raíz se diferenciarán debido a la presencia de citocininas (Dello Ioio *et al.*, 2007) y a una disminución en la concentración de auxinas en la *ZA*. Estas células se diferenciarán, eventualmente, para formar los tejidos maduros de la endodermis, el córtex, la epidermis y el cilindro vascular. Una disminución en el tamaño del meristemo significará una reducción en el número de células que entran en la *ZA*, y por lo tanto, en el número de células que se estarán alargando en un determinado momento, lo que disminuirá la tasa de crecimiento de la raíz. Esta tasa de crecimiento también disminuirá en el caso de una disminución en la tasa de alargamiento celular.

La tasa de producción celular aumentará conforme se incremente el tamaño del meristemo, lo cual tiene lugar desde el origen de la raíz primaria hasta que llega a su tamaño máximo; e irá disminuyendo conforme se reduzca el tamaño del meristemo, lo que causará que éste se determine y la raíz deje de crecer (Shishkova *et al.*, 2008). La raíz tiene la capacidad de regular el número de células proliferativas de manera espacial al mantener la proliferación hasta una cierta posición, o de manera temporal, al mantener la proliferación hasta un determinado número de ciclos celulares y ya sea que el control sea ejercido espacial o temporalmente, este mecanismo de regulación es llevado a la maquinaria de control de ciclo celular mediante señales que aún se desconocen (Baskin, 2000).

2.3 El tamaño del meristemo

El tamaño del meristemo está regulado principalmente por un balance entre dos fitohormonas, las auxinas, cuyo gradiente en la raíz tiene una mayor concentración en el nicho de células troncales (*NCT*), lo que permite el establecimiento del *CQ*, y al disminuir dicho gradiente conforme se aleja del *NCT* (Pettersson *et al.*, 2009) dará lugar a la proliferación celular (Blilou *et al.*, 2005); y su antagonico, las citocininas, que promueven la diferenciación celular en el *DT* (Dello Ioio *et al.*, 2007).

Para determinar el tamaño del meristemo Casamitjana-Martínez *et al.* (2003) contaron el número de células en las filas de córtex proximales al *CQ* que aún no se alargaban rápidamente. Moubayidin *et al.* (2010) determinaron el tamaño del meristemo de la misma manera, obteniendo un resultado similar, y propusieron que debido a la activación de los genes *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 1 (ARR1)* y *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 12 (ARR12)*, que incidirán en la percepción y respuesta de las células a las citocininas mediante la activación de *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)*, se establece un balance entre la proliferación y la diferenciación celular por lo que el tamaño del meristemo deja de aumentar a los 5 días posteriores a la germinación (dpg). Sin embargo, Beemster y Baskin (1998) previamente reportaron un incremento en el tamaño del meristemo en días posteriores al 5^{to} dpg, determinando el límite promedio del meristemo para raíces individuales como la posición en la que la tasa de producción celular alcanza un valor de cero.

En *sensu stricto*, el tiempo de vida de una célula en el meristemo no dura más que el tiempo que ésta tarda en completar la citocinesis, sin embargo, se ha calculado como el tiempo en el que la pared celular más distal de una célula sale de la zona meristemática y por lo tanto, el tiempo de vida de una célula (Ivanov, 1997) en el meristemo será directamente proporcional al número de ciclos celulares necesarios para formar todas las células en el meristemo (Beemster y Baskin, 1998). Beemster y Baskin (1998) sugirieron que al incrementar el tamaño del meristemo, el tiempo de permanencia de las células en el mismo incrementa, y que esta prolongación en el tiempo en el que las células se estarán dividiendo puede ser el evento regulatorio que incrementa la tasa total de producción celular y aumenta la tasa de crecimiento de la raíz, incidiendo en el número de células del meristemo con una tasa de alargamiento mayor (las células de la parte proximal del mismo).

Si bien, lo reportado por Beemster y Baskin (1998) y por Dello Ioio *et al.* (2007) tienen fuertes fundamentos metodológicos y conceptuales, existe una discrepancia entre sus resultados respecto al tamaño del meristemo y a cuándo deja de crecer, cuestión que es necesario aclarar para poder homogenizar criterios en el estudio de la dinámica celular de la raíz.

2.4 Tamaño celular crítico

En el ciclo celular, cuya duración es el intervalo de tiempo entre la formación de una célula y su subsecuente división (Webster y MacLeod, 1980), los procesos de síntesis de ADN y división celular (mitosis) están coordinados de modo que la replicación de todas las secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) se haya completado antes de que la célula avance hacia la siguiente fase del ciclo (Stryer *et al.*, 2003). El ciclo celular está dividido en dos partes principales: la mitosis, en la que se separan los cromosomas y ocurre la división celular; y la interfase, que es el periodo de tiempo entre el término de una mitosis y el principio de otra (Cooper y Hausman, 2009). El proceso de síntesis de ADN divide al ciclo celular en cuatro fases discretas: la fase M, donde ocurre la mitosis y posteriormente la citocinesis; la fase G_1 , que es el intervalo entre la mitosis y el inicio de la replicación del ADN; posteriormente la fase S, en la que se replica el ADN; y finalmente la fase G_2 , en la que el crecimiento celular continúa y se sintetizan proteínas para la próxima mitosis (Cooper y Hausman, 2009).

En la raíz si una célula saliese del ciclo celular, es decir, que entrase en la fase G_0 , su longitud debería incrementar en un factor de 2^n respecto a sus células vecinas que aún permanecieran en el ciclo, siendo n el número de ciclos que han pasado a partir del cual dejó de dividirse, dado que la tasa de alargamiento relativa de células vecinas es la misma (Baskin, 2000; Ivanov *et al.*, 2002). Por lo tanto, medir la longitud de las células permite inferir si éstas aún son proliferativas y calcular la tasa de división celular (Baskin, 2000).

Dobrochaev e Ivanov (2001) reportaron que el tamaño celular en el meristemo de la raíz se mantiene relativamente constante como resultado de la división de las células al alcanzar cierto tamaño crítico (l_{crit}), que es el tamaño máximo que puede alcanzar una célula proliferativa y al cuál llegará antes de dividirse, y el l_{crit} está sujeto a variación dependiendo de la región del meristemo en la que se encuentre. El l_{crit} es aproximadamente igual a la longitud de las células previa a la mitosis (l_{mit}), dado a que las células se alargan muy poco durante este proceso. El tamaño crítico juega un papel esencial para la transición a la mitosis y hay una precisión relativamente alta en dicha regulación. Los mecanismos de esta regulación pueden estar basados en la sensibilidad de las células a la proporción nucleocitoplasmática, como se ha reportado en plantas y en otros organismos (Dobrochaev e Ivanov,

2001). Dobrochaev e Ivanov (2001) mencionan que debido a que es imposible determinar precisamente el l_{crit} , es difícil decir a qué proporción l_{int}/l_{mit} (donde l_{int} es la media de la longitud de una célula en interfase) se puede considerar que las células han excedido el l_{crit} . Cuando menos dos condiciones deberían ser observadas durante la transición a la división: el que la célula alcance un tamaño crítico (lo que sucede en la fase G_2) y la culminación del ciclo mitótico. Dobrochaev e Ivanov (2001) reportaron que la transición a la mitosis en un cierto tamaño, refiriéndose al l_{crit} , es obligatoria para todo el meristemo, y que el l_{crit} difiere en diferentes tejidos y en diferentes filas de células del mismo tejido, y fluctúa, en menor medida, debido a la variabilidad individual de las raíces.

En la división celular la célula madre que es aquella célula que entra en división, dará lugar a dos células hijas, y cada cuál será la célula hermana de la otra (Esau, 1977). En la mayoría de los casos, de cada dos células hermanas la más larga será la primera en entrar a mitosis, ya que alcanzará el l_{crit} primero que la célula hermana, de modo que la duración de su ciclo celular es, en promedio, un 15% más corta (Ivanov, 1971; Webster, 1979; Barlow, 1987; Baskin, 2000). La especificidad de la l_{mit} promedio para filas individuales sugiere una herencia del l_{crit} por las células; esto es confirmado por la comparación de l_{mit} de las células hermanas y vecinas (Dobrochaev e Ivanov, 2001). Las diferencias entre las células hermanas fueron marcadamente mayores que entre las células vecinas, lo cual se debe no solo a las diferencias en l_{crit} sino también a la diferencia en tiempo de entrada de las células en mitosis, que está determinada por la diferencia en su tamaño al momento en el que aparecen (Dobrochaev e Ivanov, 2001). Para poner a prueba la robustez del l_{crit} como el principal parámetro autónomo que dará lugar a la división celular sería útil el analizar el tamaño de las células en plántulas cuyo ciclo celular esté alterado, como es el caso de *XAL1*, un gen de la familia MADS-box.

2.5 MADS-box y *XAANTAL 1 (XAL1)* o *AGAMOUS-LIKE12 (AGL12)*

El dominio MADS, nombrado a partir de haberlo encontrado en las proteínas MINICHROMOSOME MAINTENANCE 1 (MCM1), AGAMOUS (AG), DEFICIENS (DEF) y SERUM RESPONSE FACTOR (SRF), es un dominio de unión a ADN altamente conservado de una familia de factores transcripcionales codificados por los genes de la familia

MADS-box (Gramzow *et al.*, 2010). La familia de genes MADS-box está presente en los tres principales grupos de eucariontes: animales, plantas y hongos (Dubois *et al.*, 1987; Messenguy y Dubois, 2003; Gramzow *et al.*, 2010) y los genes de esta familia son clasificados, por la similitud en sus secuencias y características estructurales, en dos clases: los linajes tipo I y tipo II, los cuales derivaron de una duplicación ancestral antes de la divergencia de los animales y las plantas (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000). Las proteínas del linaje tipo II *APETALA1* (*API*), *CAULIFLOWER* (*CAL*), *AGAMOUS* (*AG*), *APETALA3* (*AP3*), y *PISTILATA* (*PI*) comparten una región de 56 aminoácidos altamente conservada, que constituye el dominio MADS (Rounsley *et al.*, 1995). Los genes MADS-box juegan diversos papeles en el desarrollo de la planta (Alvarez-Buylla *et al.*, 2000), siendo de principal interés para este trabajo *AGL12*, un gen de la familia MADS-box que está implicado en la regulación del ciclo celular (Tapia-López *et al.*, 2008).

AGAMOUS-Like 12 (*AGL12*), un gen MADS-box tipo II de *Arabidopsis thaliana*, se reportó por primera vez en la literatura en el trabajo de Rounsley *et al.* (1995), quienes ubicaron el locus del gen en el cromosoma 1 entre el marcador morfológico *apetala1* (*ap1*) y el marcador RFLP λ At237. Un análisis filogenético demostró que los genes de *A. thaliana*; *AGL12*, *AGL14*, *AGL15* y *AGL17*, divergieron muy temprano de un gen MADS-box ancestral y se expresan en tejidos vegetativos (Rounsley *et al.*, 1995). En particular, *AGL12* se expresa en la raíz primaria, cilindro central de la raíz y embriones en desarrollo (Burgeff *et al.*, 2002). Estudios posteriores demostraron que *AGL12* no solo se expresa en la raíz, sino que también se expresa, con menor intensidad, en el tejido vascular de hojas y meristemas florales, donde participa en la transición a la floración al regular positivamente a *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1* (*SOC1*), *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) y *LEAFY* (*LFY*) (Tapia-López *et al.*, 2008).

Tapia-López *et al.* (2008) caracterizaron alelos de pérdida de función de *AGL12*. Encontrando un fenotipo caracterizado por un crecimiento lento de raíz corta y floración tardía en estos alelos y renombraron a este gen como *XAANTALI* (*XALI*), del vocablo maya xaantal, que significa: “tomar más tiempo”. Como se puede observar en la Figura 2, la longitud de la raíz de *xal1-2* respecto a la de *tipo silvestre* (*WT*) es menor, siendo esta la característica fenotípica macroscópica distintiva en este mutante de pérdida de función.



Figura 2. Plántulas de *A. thaliana* de 7 dps, donde: 1) 35S::XAL1, 2) *xal1-2* y 3) WT. Barra= 1 cm.

Tapia-López *et al.* (2008) mostraron que la duración del ciclo celular en las raíces de las líneas de pérdida de función de *XAL1* es significativamente mayor, y también presentan un menor tamaño del meristemo, una disminución en la tasa de producción celular y una longitud promedio menor en las células completamente alargadas. Estos datos sugieren que *XAL1* participa en la regulación del ciclo celular, en el tamaño del meristemo y en el alargamiento de las células de la raíz. Utilizando las líneas reporteras *XAL1::GUS* y *XAL1::GFP* se demostró que la expresión de este gen en el floema se activa mediante auxinas (IAA) (Tapia-López *et al.*, 2008). También se ha reportado que al expresar a *XAL1* de *A. thaliana* en una línea de células de *Catharanthus roseus* en suspensión se forman cuerpos globulares parenquimatosos y se induce la biosíntesis de ajmalicina (Montiel *et al.*, 2007).

Dado que *xal1-2* presenta alteraciones en la duración del ciclo celular y en el tamaño del meristemo (Tapia-López *et al.*, 2008) este alelo de pérdida de función, junto con líneas de sobreexpresión 35S::XAL1, son una buena herramienta para estudiar la regulación de la división celular en la raíz de *A. thaliana*. Al estar alterada la duración del ciclo celular en *xal1-2* surge la pregunta: ¿esta mayor duración se debe a que las células se dividen a un tamaño crítico mayor o simplemente tardan más tiempo en alcanzar ese tamaño crítico? La respuesta a esta pregunta implica conclusiones diferentes. Si el tamaño crítico de división celular se mantiene en mutantes con un ciclo celular más largo, esto supondrá que la tasa de crecimiento celular es menor. En contraste, si la tasa de crecimiento celular se mantiene igual en mutantes con un ciclo celular más largo, el tamaño crítico de división celular se

verá alterado. El análisis de la distribución de las longitudes de las células a lo largo del meristemo puede proporcionar información acerca de las posibles causas de la alteración del ciclo celular en alelos de pérdida de función de *XALI*. Por otro lado, el analizar el tamaño del meristemo a lo largo del tiempo puede ayudar a explicar las razones de su reducido tamaño en *xal1-2* en comparación con las raíces *WT*. Este análisis proporcionará una visión dinámica del comportamiento de los meristemos de raíces *WT*, así como de los fondos de pérdida y ganancia de función del *XALI*. En este trabajo se presenta un análisis comparativo de la distribución de la longitud de las células de córtex en la zona de crecimiento (meristemo y *ZA*) de la raíz de *Arabidopsis thaliana* en tres fondos genéticos distintos: raíces *WT*, y líneas de pérdida de función y sobreexpresión de *XALI*. Se analizaron células de córtex pues son fácilmente identificables en el plano medio. Este análisis comparativo se hizo además en dos edades distintas, 7 y 9 días posteriores a la siembra (dps).

3. JUSTIFICACIÓN

El gen MADS-box *XAANTALI* (*XALI*) es, hasta el momento, el único gen de esta familia en *Arabidopsis thaliana* cuya función se ha relacionado con la regulación de la duración del ciclo celular y el tamaño del meristemo apical de la raíz. A pesar de lo anterior, no se ha hecho un análisis cuantitativo a nivel celular en diferentes tiempos, que pueda generar indicios de los procesos en los que participa este gen. En este trabajo se propone realizar un análisis de la distribución de las longitudes de células de córtex en la zona de crecimiento de la raíz, caracterizando espacial y temporalmente el meristemo en fondos de pérdida y ganancia de función de *XALI* y comparándolo con raíces *WT*. Este tipo de análisis es poco realizado a detalle en diferentes condiciones experimentales a pesar de la gran cantidad de información que genera.

4. OBJETIVO

- Realizar un análisis comparativo de la distribución de las longitudes de células de córtex en la zona de crecimiento de la raíz de *A. thaliana* en alelos de pérdida y ganancia de función de *XALI* y *WT* en dos edades distintas de crecimiento de la plántula.

Objetivos particulares

- Determinar si el tamaño crítico de división celular es afectado en alelos de ganancia y pérdida de función de *XALI*, producto de alteraciones en la duración del ciclo celular.
- Desarrollar una propuesta metodológica para delimitar el meristemo en los diferentes fondos genéticos analizados basándonos en la longitud de las células de córtex a lo largo de una fila.
- Analizar el comportamiento del meristemo en los distintos fondos analizados en dos tiempos distintos y determinar si el meristemo ha dejado de crecer o no.

5. HIPÓTESIS

Los cambios en el balance entre proliferación y diferenciación celular de la raíz, así como posibles cambios en el tamaño crítico de células que entran a la división celular, deberán reflejarse en la distribución de las longitudes de las células del meristemo y la ZA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Todas las líneas estudiadas en este trabajo se encuentran en el ecotipo Col-0. La línea de pérdida de función *xal1-2* es un alelo de inserción de T-DNA procedente de NASC 429367/GabiKat_306H03 (Tapia-López *et al.*, 2008). La línea 5.2 de ganancia de función *35S::XAL1* es una línea 2x (es decir, que tiene dos veces el promotor de 35S) fusionado a cDNA, generada por Tapia-López *et al.* (2008).

6.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas se esterilizaron en etanol al 100% durante cinco minutos, con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio y SDS 1% por trece minutos con agitación. Finalmente se lavaron cinco veces con agua estéril. Finalmente las semillas fueron incubadas a 4°C durante 24 horas, pasando este tiempo fueron sembradas en placas de Petri con medio de crecimiento constituido por sales MS 0.2X (pH 5.6); 1% de sacarosa, 1% de agar, 0.05% de MES y no se adicionaron vitaminas. Las placas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 22°C de temperatura, con un fotoperiodo de (110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de 16 hora de luz y 8 horas de oscuridad y mantenidas en posición vertical durante 7 y 9 días.

6.3 Microscopia

Con el fin de aclarar las raíces para poder hacer observaciones bajo el microscopio las plántulas de 7 y 9 dps se colocaron en reactivo de Herr (Herr, 1971) por un periodo mínimo de 48 horas a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo se montaron en solución de Herr para ser observadas en el microscopio con Contraste Diferencial de Interferencia (CDI) (Olympus™ BX60). Se tomaron fotografías con objetivos de 20X para el meristemo y ZA, y 40X para la parte más distal del meristemo (con una cámara RS Photometrics ColSNAP-Pro COLOR Imaging) desde el ápice de la raíz hasta la primer célula de epidermis que presentara un primordio de pelo radicular (zona madura) de las plántulas aclaradas. Se analizaron 10 raíces por fondo genético en cada una de las 3 repeticiones independientes.

Para preparar 10.5 ml de reactivo de Herr:

- 3 ml de ácido láctico al 85%

- 0.3 g de hidrato de cloral
- 3 ml de fenol
- 3 ml de aceite de clavo
- 1.5 ml de xileno

6.4 Medición de las células de córtex en la raíz

Para la medición celular se utilizó el mismo método que Galinha *et al.* (2007). Utilizando el programa Image J se midió secuencialmente la longitud de las células de córtex de una fila, desde la célula inicial de córtex hasta la célula de córtex adyacente a la primer célula epidérmica que presentara un bulto de pelo radicular (zona madura).

6.5 Determinación de la Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo (LCELM)

En una fila de córtex se buscó la célula más larga en el *DPC* y se duplicó su tamaño para obtener una Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo provisional (*LCELM_p*), a partir de la cual se obtuvo un primer límite, posteriormente se promedió la longitud de las células desde el *CQ* hasta la *LCELM_p* y se duplicó, para obtener la longitud de la *LCELM*. Dicho valor supone la mínima longitud que puede presentar una célula para encontrarse fuera del meristemo.

6.6 Delimitación de las zonas de la raíz

Mediante la *LCELM* se hizo una aproximación de cuál es la célula más distal que se encuentra fuera del límite del *DPC*. Para determinar el tamaño del meristemo en cada raíz se contó el número de células, desde la inicial de córtex hasta la célula anterior a la *LCELM*. La *ZA* se delimitó desde la frontera con el meristemo (límite previamente mencionado) hasta la célula de córtex adyacente a la primera célula epidérmica que presentara un primordio de pelo radicular (zona madura).

6.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico R (R Development Core Team, 2012). Para comparar los parámetros celulares entre los días 7 y 9 dps se utilizó la prueba de Wilcoxon para dos muestras (U Mann-Whitney), y para comparar los parámetros celula-

res entre los fondos *xal1-2*, *35S::XAL1* y *WT* se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis por ser un método no paramétrico aplicable a 3 o más grupos.

7. RESULTADOS

7.1 Delimitación del meristemo

Hasta el día de hoy, aún no se ha llegado a un consenso sobre el límite de las distintas zonas en el ápice de la raíz, sobre todo en el límite que separa la zona meristemática de la zona de diferenciación. Es complicado delimitar de manera precisa el meristemo debido a que varía para los distintos tejidos de la raíz (Webster y MacLeod, 1980). Por ejemplo en el caso del córtex los límites son difusos (Ivanov y Dubrovsky, 2012), y se han propuesto distintos métodos para delimitarlo; que incluyen enfoques citológicos, a partir de la tasa de proliferación celular (Beemster y Baskin, 1997); fisiológicos, a partir de patrones de expresión genética (Dello Ioio *et al.*, 2007); y citométricos, como en el caso del presente trabajo.

En este trabajo se abordó este problema a través de un análisis de la distribución de las longitudes celulares, midiendo desde la pared celular más distal a la pared celular más proximal de células individuales en una fila de córtex, partiendo de la célula inicial hasta la célula contigua al nivel en el que se encuentra la primera célula de epidermis que presentara un bulto de pelo radicular. De esta manera se obtuvo el perfil de longitudes celulares del meristemo y de la ZA (Fig. 3).

Se designó una Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo para poder hacer una aproximación al límite del meristemo y esto se hizo bajo el criterio: "una célula cuya longitud es dos veces mayor al l_{crit} determinado para una raíz ya no puede encontrarse dentro de la zona proliferativa" y se designó a la célula que cumpliera con esa característica como la Longitud Celular Estimada en el Límite del Meristemo (*LCELM*), tomando como referencia que tuviera el doble de la longitud de la célula más larga en el *DPC* (ver MATERIALES Y MÉTODOS). La célula más larga en este dominio sería la que está más próxima que las demás a dividirse (la que más se acerca al l_{mit} o l_{crit}) por lo tanto, al tomar su longitud y duplicarla se obtiene una longitud considerablemente mayor a la del l_{crit} . Aun cuando no se puede designar el tamaño calculado como el l_{crit} , esta medida permite delimitar tentativamente el meristemo (*DPC* y *DT*), ya que supone que todas las células del *DPC* y una parte considerable del *DT* sean incluidas, a partir de un criterio que si bien es arbitrario, resulta práctico porque es reproducible al no depender del criterio de la persona que analiza el meristemo para delimitarlo.

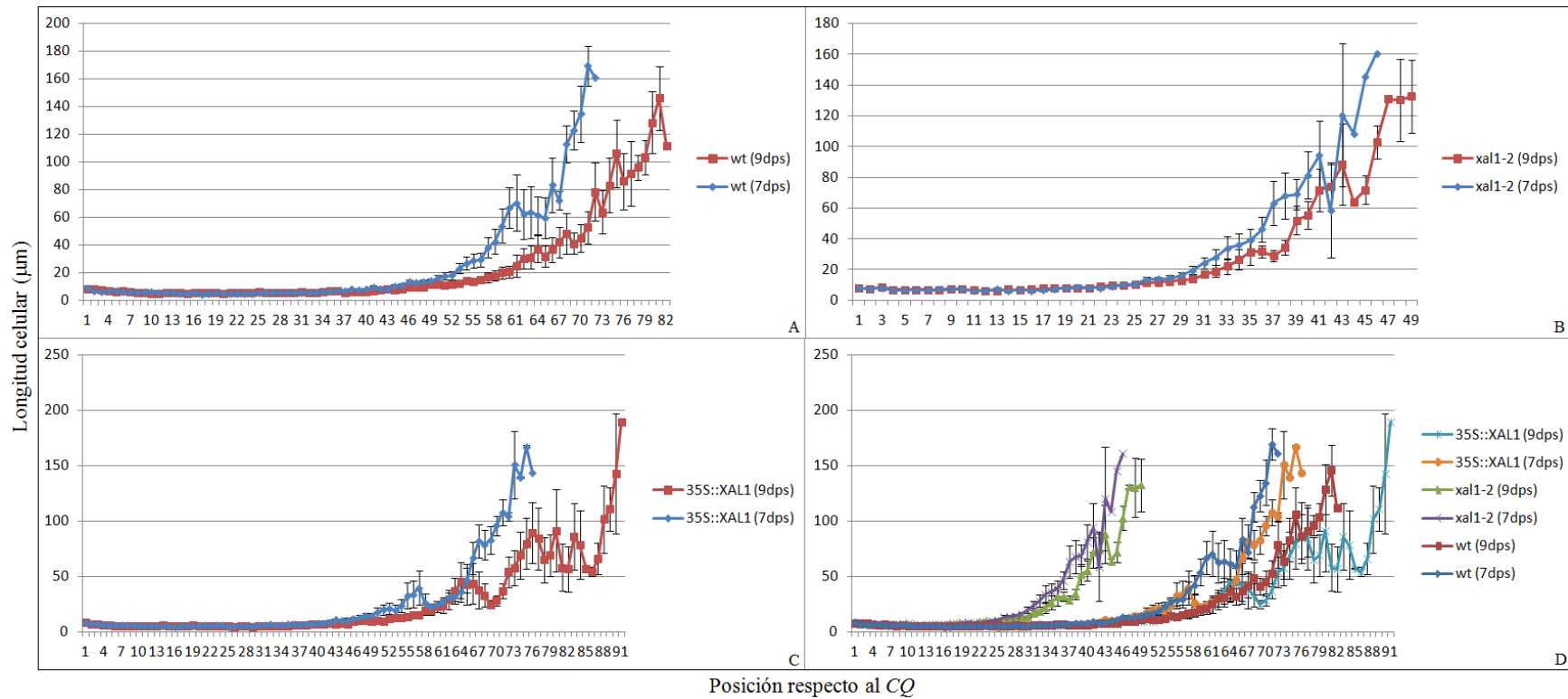


Figura 3. Longitud de las células del meristemo y de la ZA expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico, y su posición respecto al CQ. Donde: **A**, WT a 7 y 9dps. **B**, *xal1-2* a 7 y 9dps. **C**, *35S::XAL1* a 7 y 9dps. **D**, comparación entre plántulas WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* a 7 y 9dps. (n=10).

En la Figura 4 se puede observar la delimitación del meristemo a partir del criterio de *LCELM* (marcada en amarillo), y el límite entre la *ZA* y la zona madura (marcado en verde), este último identificado como la primera célula de epidermis con un bulto de pelo radicular. Resalta el hecho de que la *LCELM* se encuentra claramente antes de que se observe un incremento considerable de la longitud de las células de córtex, por lo que en ningún caso de los analizados dicha célula perteneció a la *ZA*. Además se encuentra en la zona del *DT*, designada por Ivanov y Dubrovsky (2012), lo que muestra que el criterio de la *LCELM* es una buena aproximación para delimitar el *DPC*, y por lo tanto para determinar el tamaño del meristemo de una forma no arbitraria y sobre todo reproducible.

Para determinar qué tan variable es el valor de la *LCELM*, se decidió analizar los valores de las *LCELM* para cada una de las raíces individuales. En el Cuadro 1, se presentan los promedios de los valores de la *LCELM* para los fondos analizados, en 7 y 9 dps en uno de los experimentos realizados. Lo que es importante destacar, es el hecho de que este valor tiende a permanecer constante entre las diferentes condiciones experimentales analizadas. Además es necesario recordar que toda medición tiene un grado de incertidumbre², en este caso las mediciones tienen un error de $\pm 2.5\mu\text{m}$, por lo que la dispersión del error en las medidas es mayor que la desviación típica mostrada en el Cuadro 1. Con lo anterior se puede concluir que el valor de la *LCELM* tiende a permanecer constante entre raíces con el mismo fondo genético, lo que es un argumento muy fuerte en favor de la implementación de este método para la delimitación del meristemo, ya que le confiere reproducibilidad y facilita el comparar resultados de diferentes experimentos.

Como sugieren Ivanov y Dubrovsky (2012), otra forma de determinar los límites del meristemo —es decir la zona donde baja la probabilidad de que las células se dividan y a su vez comiencen a alargarse rápidamente— es a través del perfil de las longitudes de las células. Estos perfiles de longitudes celulares se obtuvieron para cada una de las raíces analizadas. En las Figuras 3 y A1 se muestran los perfiles de las longitudes de todas las células de una fila de córtex, desde la célula inicial hasta la zona madura. En estas gráficas es relati-

² Ya que no hay una herramienta que permita obtener una medición exacta de un objeto, todas las mediciones serán aproximaciones a la realidad, lo que supone que en toda medición siempre habrá una incertidumbre. Fue evaluada según la distancia entre las líneas del retículo ocular micrométrico.



Figura 4. Meristemo y ZA a 20x a 7 dps, donde: **A**, *35S::XAL1*. **B**, *WT*. y **C**, *xal1-2*. Las células cuya pared está marcada en amarillo y verde denotan la *LCELM* y primer bulto de pelo radicular en célula epidérmica, respectivamente. Barra= 100 μm .

Cuadro 1. Longitud promedio (μm) de la *LCELM* en *WT*, *xal1-2* y *35S::XAL1* a 7 y 9dps ($n=10$).

	7dps ($\bar{x} \pm \text{DE}$)	9dps ($\bar{x} \pm \text{DE}$)
<i>WT</i>	15 \pm 1	15 \pm 1
<i>xal1-2</i>	17 \pm 1	18 \pm 2
<i>35S::XAL1</i>	14 \pm 1	14 \pm 1

vamente sencillo identificar visualmente los puntos de inflexión, es decir, donde las longitudes de las células aumentan rápidamente en relación a su distancia del *CQ*, es decir, el límite del meristemo.

Estos perfiles, además permiten comparar rápidamente cambios en el tamaño del meristemo en diferentes condiciones experimentales. Por ejemplo, en las Figuras 3-A, 3-C, 3-D y A1, puede observarse rápidamente que hay un incremento en el tamaño del meristemo de 7 a 9 dps en los fondos *WT* y *35S::XAL1*, al presentarse un desplazamiento a la derecha de dicho punto de inflexión, es decir, en un punto más lejano al *CQ*. En la Figura 3-D, se observa claramente que el meristemo de *xal1-2* es más pequeño que en los otros dos fondos tanto a los 7 como a los 9 dps, lo que concuerda con lo previamente reportado por Tapia-López *et al.* (2008). Lo anterior, muestra que generar estos perfiles de longitudes celulares es una herramienta muy útil para analizar el meristemo de las raíces. Además que los mismos perfiles permiten delimitar el meristemo a través del criterio de *LCELM*, que de hecho marca el límite del meristemo en la zona cercana al punto de inflexión de los perfiles.

7.2 Parámetros celulares en el meristemo

Habiendo delimitado el meristemo y la *ZA* a partir de éste método se analizaron otros parámetros celulares que pudiesen aportar información relevante respecto al l_{crit} y tamaño del meristemo. Se decidió analizar a los 7 y 9 dps la **longitud de las células meristemáticas**, que es la longitud desde la pared celular distal a la pared celular proximal en las células meristemáticas (medida en μm); la **longitud celular máxima en el meristemo**, que es la longitud de la célula más larga registrada en el meristemo (medida en μm); y el **número de**

células en el meristemo, que es el número de células desde la célula inicial de córtex hasta la *LCELM*.

7.2.1 Parámetros celulares en el meristemo concernientes al l_{crit}

Aun cuando el l_{crit} se ha analizado en células de córtex de maíz y trigo (Dobrochaev e Ivanov, 2001), hasta la fecha no ha sido analizado en plantas cuyo ciclo celular está alterado, por lo cual se incluyó a *xall-2* en este proyecto. Como se mencionó en la introducción, el ciclo celular en el meristemo de la raíz de *xall-2* es de mayor duración que en el de las raíces *WT* (Tapia-López *et al.*, 2008).

En la Figura 5 se muestra el perfil de las longitudes de las células meristemáticas de córtex de una raíz *WT* representativa. Esta gráfica nos muestra la variación en las longitudes de las células, a diferencia de lo que se observa en la Figura 3 donde se muestran los promedios de varias raíces. Se espera que las longitudes de las células en el meristemo varíen entre dos extremos, la longitud de células que recién se han dividido (el límite inferior), y la longitud de las células que están a punto de dividirse (el límite superior).

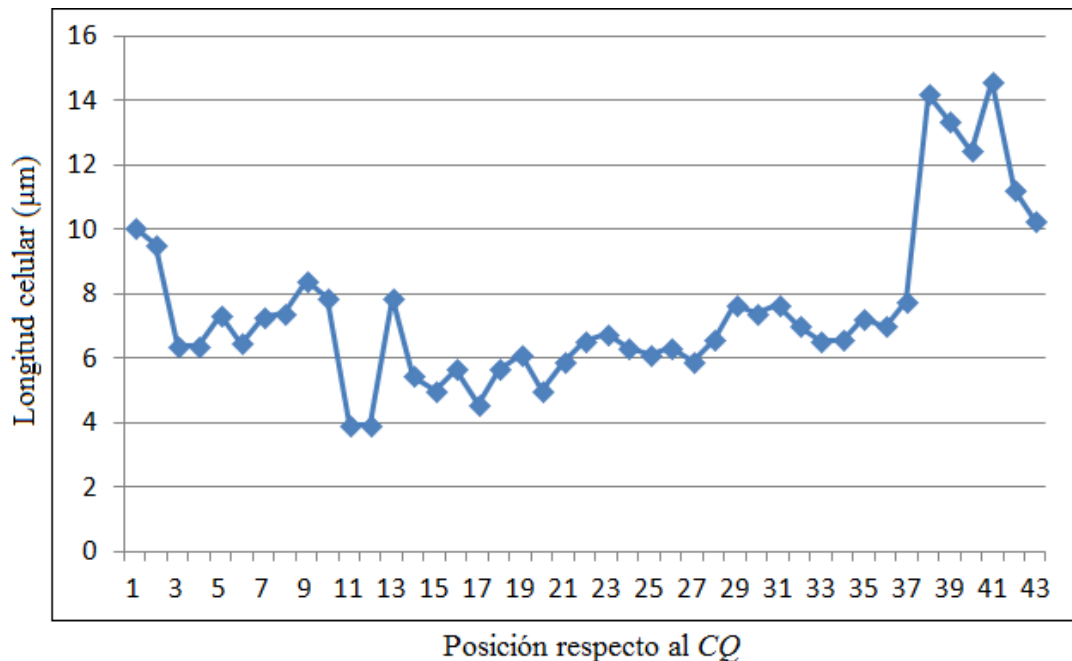


Figura 5. Longitud de las células del meristemo expresada en μm y su posición respecto al *CQ* en una raíz representativa *WT* de 7dps.

En la parte central de la gráfica de la Figura 5 se puede observar que las longitudes varían entre 4 y 8 μm aproximadamente, siendo 7 μm el tamaño promedio de las células meristemáticas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Longitud promedio (μm) de la células meristemáticas en plántulas *WT*, *xall-2* y *35S::XAL1* a 7 y 9dps ($n=30$).

	7dps ($\bar{x} \pm \text{ET}$)	9dps ($\bar{x} \pm \text{ET}$)
<i>WT</i>	6.9 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1
<i>xall-2</i>	7.9 \pm 0.1	8.5 \pm 0.1
<i>35S::XAL1</i>	6.9 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1

Dado que en este trabajo no se usaron marcadores celulares para poder determinar cuáles células son mitóticas y cuáles están en interfase, solo contamos con el tamaño de las células como indicador de si las células son o no meristemáticas y solo podremos tener aproximaciones al l_{crit} . La mejor aproximación que podemos tener es la de considerar el tamaño de la célula más grande que encontremos dentro de los límites del meristemo, una vez delimitado por el criterio de la *LCELM*.

La comparación de las longitudes celulares máximas del perfil de longitudes celulares del meristemo en las diferentes condiciones analizadas se muestra en la Figura 6. Esta comparación no muestra cambios significativos en el tamaño máximo de las células meristemáticas, sobre todo entre *WT* y *xall-2* a los 7dps, que son los fondos donde Tapia-López *et al.* (2008) reportaron que hay una diferencia significativa en la duración del ciclo celular. Bajo el supuesto de que no hay cambios en la tasa de alargamiento de las células en los dos fondos, se hubiera esperado una diferencia mayor en el tamaño de las células, al tener más tiempo para crecer. Estos datos nos sugieren fuertemente que no hay alteraciones en el l_{crit} , en los diferentes genotipos analizadas. A partir de lo previamente establecido hay que considerar que la incertidumbre de nuestras mediciones es $\pm 2.5\mu\text{m}$, lo que incrementa la variación que tenemos en nuestras comparaciones, razón por la cual hay que tener cuidado al

interpretar que en el análisis estadístico exista una diferencia significativa entre los tratamientos a los 9 dps.

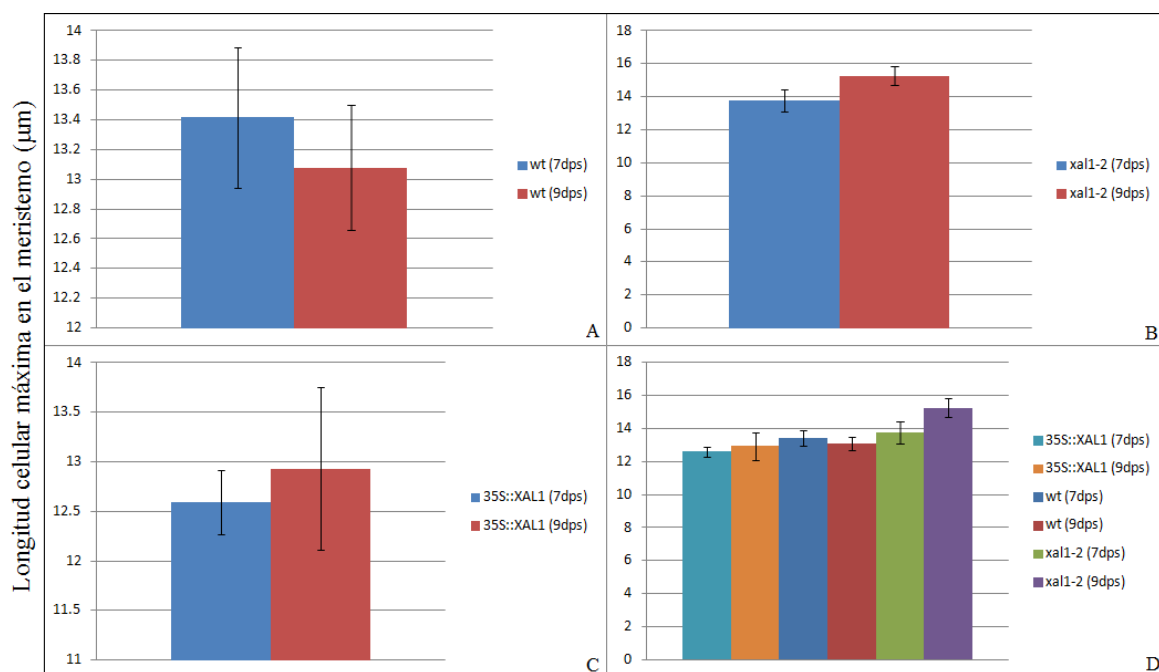


Figura 6. Longitud celular máxima en el meristemo expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) donde la significancia fue de: A, $p>0.05$. B, $p>0.05$. C, $p>0.05$. D, Entre los fondos *WT*, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p>0.05$, y en 9dps de $p<0.05$.

Dado lo anterior, podemos suponer que lo que está alterado en *xal1-2* es la tasa de alargamiento con respecto a las raíces *WT*. Es decir, las células tardan más tiempo en alcanzar el mismo l_{crit} que en *WT*, el cual permanece inalterado.

7.2.2 Tamaño del meristemo

El tamaño del meristemo en *A. thaliana* se ha medido por distintos autores (Beemster y Baskin, 1998; Dello Ioio *et al.*, 2007) y con distintos criterios a partir de un parámetro celular: el número de células en una fila de córtex. Dello Ioio *et al.* (2007) reportan que el meristemo deja de crecer a los 5 días post germinación (dpg), momento en que el meristemo alcanza un equilibrio entre la proliferación y la diferenciación celular y tiene su tamaño máximo. Sin embargo, observaciones hechas en el laboratorio sugieren que el meristemo si

aumenta su tamaño en días posteriores a los 5 dpg reportados por Dello Ioio *et al.* (2007). Otros grupos también reportaron un incremento en el tamaño del meristemo posterior a los 5 dpg (Beemster y Baskin, 1998).

En el laboratorio se determinó si existe o no un crecimiento del meristemo posterior a los 7dps, equivalente a los 5 dpg de Dello Ioio *et al.* (2007). Como se mencionó anteriormente, los perfiles de longitud celular respecto a la posición (Fig. 3) muestran un aumento en el número de células en el meristemo de 7 a 9 dps, tanto en raíces *WT* como en raíces *35S::XAL1*, no así en raíces *xal1-2*. Este incremento se denota claramente al observarse un desplazamiento a la derecha del punto de inflexión, lo que indica claramente que el meristemo tiene más células en 9dps que en 7dps, excepto en *xal1-2*.

Usando el criterio de la *LCELM* para delimitar el meristemo, se obtiene el mismo resultado. Esto es, que contrastando con lo reportado por Dello Ioio *et al.* (2007) y en concordancia con lo reportado por Beemster y Baskin (1998), que en nuestras condiciones experimentales el meristemo tiene un mayor número de células a los 9dps que a los 7dps en *WT*, y además en este trabajo se aporta que el meristemo de *35S::XAL1* también tiene un mayor número de células a los 9 dps respecto a los 7 dps y que en *xal1-2* esto no sucede (Fig. 7 y Cuadro 3). Esto nos indica que el meristemo aún sigue creciendo en *WT* y *35S::XAL1* después de los 7 dps, mientras que en *xal1-2* ya ha dejado de crecer. Lo anterior representa nueva información para la caracterización de este gen y aporta información necesaria para diseñar experimentos futuros que ayuden a explicar por qué *xal1-2* presenta una raíz más pequeña.

Cuadro 3. Número de células en el meristemo en *WT*, *xal1-2* y *35S::XAL1* a 7 y 9dps (n=30).

	7dps ($\bar{x} \pm ET$)	9dps ($\bar{x} \pm ET$)
<i>WT</i>	44 \pm 1	51 \pm 2
<i>xal1-2</i>	29 \pm 1	30 \pm 1
<i>35S::XAL1</i>	43 \pm 1	50 \pm 2

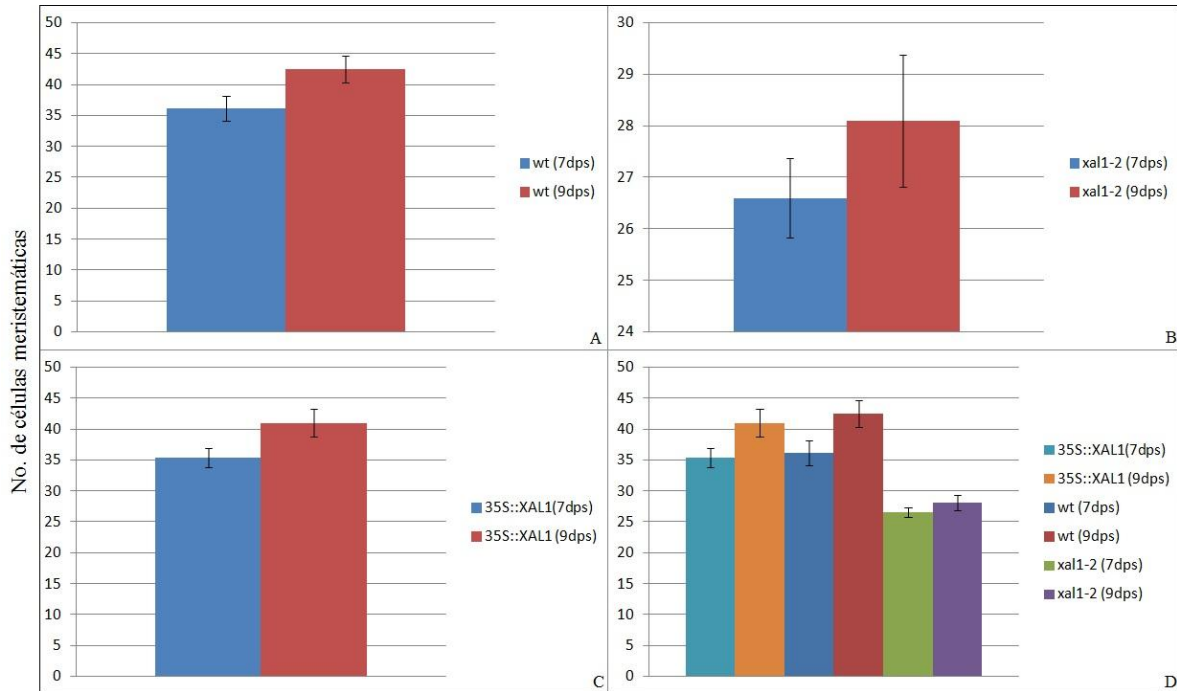


Figura 7. Número de células en el meristemo expresado como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) donde la significancia fue de: A, $p>0.05$. B, $p<0.07$. C, $p<0.06$. D, Entre los fondos WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<1 \times 10^{-5}$, y en 9dps de $p<0.0005$.

8. DISCUSIÓN

Si bien, aún no se ha estandarizado un único método para delimitar el meristemo, en este trabajo se propone una alternativa menos costosa y más sencilla. Es importante destacar que los resultados obtenidos al aplicar este método coinciden con los de un estudio actual independiente (Grieneisen *et al.*, 2012) lo cual puede ser un criterio para validar el método que llamamos criterio de *LCELM*.

Una ventaja del método de la *LCELM* se vuelve evidente en el análisis de otros fondos genéticos. Normalmente para delimitar el meristemo en otros fondos es necesario generar líneas con un marcador molecular de meristemo por cada gen a analizar, sin embargo mediante este método de perfil de longitudes celulares puede delimitarse en diferentes líneas o fondos genéticos sin necesidad de marcadores, ahorrando tiempo, recursos y evitando las alteraciones que pudiesen suponer al sistema el incorporar agentes externos. Una vez obtenido el perfil de longitudes, el meristemo puede delimitarse identificando el punto de inflexión (Ivanov y Dubrovsky, 2012), para lo que se tiene que modelar la curva del perfil de longitudes, sin embargo eso requeriría de una mayor cantidad de análisis, los cuáles pueden evitarse al delimitarlo mediante la *LCELM*.

Si bien, el método para delimitar al meristemo propuesto en este trabajo no es absoluto, se le puede someter a distintas pruebas para validarlo, dentro de las cuáles se incluirían análisis de genes cuyo patrón de expresión esté delimitado para ciertas zonas (*DPC*, *DT* o *ZA*) o que estén involucrados en el incremento en la tasa de alargamiento celular. Por tal motivo se realizaron una serie de experimentos cuyos resultados preliminares utilizando plántulas *WT* con marcador de *CCS52A1::GUS* parecen validar este método. Y si bien en este trabajo se utilizó para evaluar el tamaño del meristemo en *WT*, *35S::XAL1* y *xal1-2*, puede utilizarse en cualquier otro mutante y sin la necesidad de marcadores *GUS* o *GFP*.

8.1 Parámetros celulares en el meristemo concernientes al l_{crit}

Uno de los ejes principales de la tesis era el evaluar si el l_{crit} se mantenía aun cuando un fenómeno tan importante como el ciclo celular se veía alterado y con ese fin se eligió traba-

jar con *xal1-2*; y para poder delimitar el meristemo se desarrolló el método de la *LCELM* según el criterio que se expone a continuación.

Ya que el l_{mit} es aproximadamente $l_{int} \times 2$ (Cooper y Hausman, 2009), se buscó la célula más larga en la parte distal de la zona proliferativa (donde se tiene la certeza de que las células forman parte del *DPC*) y se duplicó su longitud para obtener la longitud de la *LCELM*, de manera que se abarcara no solo la *DPC* (donde las células miden l_{int} aproximadamente), sino también el *DT* (donde las células miden $>l_{int}$) en la que las células, que aún tienen la capacidad de dividirse, empiezan a alargarse a una tasa mayor. En *WT* el l_{crit} debe ser aproximadamente el doble de la longitud de una célula en la zona proliferativa del meristemo, las cuales miden 7 μm aproximadamente (Cuadro 3).

Según el método desarrollado en este trabajo, la *LCELM* en *WT* a 7dps fue de 15 μm (Cuadro 1), siendo un resultado similar al obtenido por Grieneisen *et al.* (2012). Beemster y Baskin (1998) proponen que la *LCELM* es de $39.5 \pm 0.41 \mu\text{m}$. Dichos resultados están muy por encima del l_{crit} (con longitudes que sobrepasan el doble del l_{crit}), lo que supone que el meristemo delimitado por su método abarca una fracción considerable de la *ZA* y por lo tanto no está delimitando únicamente al meristemo.

La información proporcionada por este análisis sugiere que el tamaño crítico de división no cambia de manera significativa en los fondos analizados, por lo que la alteración en la duración del ciclo celular en *xal1-2* puede deberse a cambios en la tasa de crecimiento de las células en el meristemo. Además, el análisis temporal mostró que los meristemos *WT* continuaron creciendo después de 7 dps —contrario a lo publicado previamente por Dello Ioio *et al.* (2007)— no así los meristemos de *xal1-2*. Todo lo anterior constituye una importante aportación a la caracterización de la función de *XAL1* en la regulación de la homeostasis celular en el meristemo apical de la raíz de *A. thaliana*.

Al analizar las longitudes de las células en los meristemos de raíces *WT* y de *xal1-2* esperábamos encontrar alguno de los siguientes escenarios: si no se observaban diferencias claras en el tamaño de las células meristemáticas en los fondos genéticos con duración del ciclo celular distintas, los cambios en la duración del ciclo celular podrían deberse a diferentes tasas de alargamiento en dichas células; en cambio, si se lograban observar cambios significativos en la longitud de las células meristemáticas la tasa de alargamiento de las

células probablemente no estaría alterada, y sí se haya alterado el l_{crit} , debido tal vez a alteraciones en los mecanismos que tienen las células para percibir su tamaño. Los resultados de éste trabajo muestran que el l_{crit} no está alterado y es, por lo tanto, una diferencia en la tasa de alargamiento de las células lo que tiene como resultado un ciclo celular más largo.

8.2 Tamaño del meristemo

Según lo reportado por Dello Ioio *et al.* (2007), el meristemo de la raíz de *A. thaliana* alcanza su mayor tamaño a los 5 dpv a pesar de que había un reporte previo de Beemster y Baskin (1998) en donde reportaron que el meristemo sigue creciendo de 8 a 10 dps. En el laboratorio se sabía de manera preliminar que el meristemo sigue aumentando su tamaño después del séptimo día post siembra (Mario Pacheco, datos no publicados); por lo que en éste trabajo se estableció un método que permitiese evaluar el incremento en el tamaño del meristemo. Es importante aclarar esta disparidad, ya que en la actualidad se siguen citando los resultados de Dello Ioio *et al.* (2007), y esto supone un velo conceptual para la investigación sobre la biología de la raíz. La diferencia entre los resultados obtenidos por Dello Ioio *et al.* (2007) y Beemster y Baskin (1998) respecto al crecimiento del meristemo bien puede deberse al método que utilizaron para delimitar la zona meristemática o a diferencias en las condiciones de crecimiento.

En este trabajo, el número de células en el meristemo, que es el parámetro utilizado por otros autores (Beemster y Baskin, 1998; Dello Ioio *et al.*, 2007; Moubayidin *et al.*, 2010) para medir el tamaño del meristemo, incrementó de manera significativa del día 7 al día 9 dps tanto en *WT* como en la línea *35S::XAL1*. Por lo tanto, concluimos que en nuestras condiciones experimentales el meristemo sigue creciendo después de los 7 dps, y que no alcanza su tamaño máximo en este tiempo según lo reportado por Dello Ioio *et al.* (2007). En éste trabajo se registró un promedio de 50 células meristemáticas a los 7dps en *WT*, que incrementó a 57 células a los 9 dps. Beemster y Baskin (1998), también proponen un incremento de células en el meristemo, de 52 ± 3 células a los 8dps, a 70 ± 3 células a los 10dps; pero ambos resultados contrastan con los de Dello Ioio *et al.* (2007), quienes reportan que a los 7 dps, cuando se activa la expresión de *ARR1*, el meristemo alcanza su tamaño final en el que cuenta con 30 células y que en este punto se alcanza el equilibrio entre la tasa de división celular y la tasa en la que las células pasan de la zona proliferativa del me-

ristemo a la zona de alargamiento. Haciendo un análisis del reporte previamente mencionado, observamos que no cuentan las células posteriores a la 30^{va} como parte del meristemo y por tanto no incluyen la zona más proximal y creemos que la diferencia en sus resultados y los obtenidos por Beemster y Baskin (1998) y el presente trabajo radica en su forma de delimitar al meristemo.

La tasa de producción celular es el incremento en el número de células producidas por el meristemo por unidad de tiempo (Webster y MacLeod, 1980) y dicho parámetro es menor en *xal1-2* que en *WT* y *35S::XAL1*. Esto se explica porque las plántulas de *xal1-2* poseen un número significativamente menor de células meristemáticas, lo cual puede deberse a que *XAL1* podría estar regulado por las citocininas (Tapia-López *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que aún cuando el método utilizado por Tapia-López *et al.* (2008) para delimitar el meristemo es distinto, ya que utiliza como parámetro el encontrar una célula cuya longitud sea más del doble de la longitud de su célula vecina más distal, los resultados de este trabajo van acorde a lo reportado previamente por ellos respecto al meristemo de *xal1-2* en comparación al *WT*, aunque en éste trabajo además se incluyeron los análisis de la línea de sobreexpresión *35S::XAL1* y de los tres fondos a los 7 y 9 dps. Los análisis de *35S::XAL1* muestran que no hay diferencias significativas entre esta línea de sobreexpresión y *WT*. Según Tapia-López *et al.* (2008) el meristemo de *xal1-2* tiene un menor número de células en comparación al *WT*, lo cual concuerda con los resultados de este trabajo en ambos tiempos. Es relevante destacar que los análisis de la distribución de longitudes celulares muestran que el meristemo de *xal1-2* deja de crecer a los 7 dps o antes, a diferencia de los fondos *WT* y *35S::XAL1* en los que sigue creciendo (Figs. 2D, 6D y 7D). Resulta interesante saber el momento en que este equilibrio prematuro de *xal1-2* se alcanza, pues esta información serviría para guiar las investigaciones fisiológicas y moleculares que puedan determinar con mayor precisión las causas del fenotipo de raíz corta de *xal1-2*, y por lo tanto permitan comprender más a fondo la función de *XAL1*.

9. CONCLUSIONES

- El criterio de la *LCELM* constituye una propuesta útil para delimitar de manera sencilla, poco costosa, y sobre todo reproducible el límite del meristemo apical de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.
- No hay diferencia significativa en los parámetros celulares analizados entre *WT* y *35S::XAL1*.
- El meristemo de *A. thaliana* tanto en *WT* como en *35S::XAL1* crece después de los 7 dps. Lo cual no ocurre en *xal1-2*.
- El l_{crit} de división no se alteró significativamente en los fondos y tiempos analizados.

10. REFERENCIAS

- Alvarez-Buylla, E., Liljegren, S. J., Pelaz, S., Gold, S. E., Burgeff, C., Ditta, G. S., Vergara-Silva, F., et al. (2000). MADS-box gene evolution beyond flowers: expression in pollen, endosperm, guard cells, roots and trichomes. *The Plant Journal*, 24(4), 457-466.
- Baskin, T. (2000). On the constancy of cell division rate in the root meristem. *Plant Molecular Biology*. 43: 545-554.
- Barlow, P.W. (1987). Cellular packets, cell division and morphogenesis in the primary root meristem of *Zea mays* L. *New Phytol.* 105: 27-56.
- Beemster, G. T. S., & Baskin, T. I. (1998). Analysis of Cell Division and Elongation Underlying the Developmental Acceleration of Root Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116(4), 1515-1526.
- Benfey, P., & Scheres, B. (2000). Root development. *Curr Biol*. 10: R813-R815.
- Benfey, P., & Schiefelbein, J. (1994). Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation. *Trends in genetics : TIG*, 10(3), 84-88.
- Bililou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39-44.
- Burgeff, C., Liljegren, S., Tapia-López, R., Yanofsky, M. y Álvarez-Buylla, E. (2002). MADS-box gene expression in lateral primordial, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. 214: 365-372.
- Caro, E., Castellano, M., Gutierrez, C. (2007). A chromatin link that couples cell division to root epidermis patterning in *Arabidopsis*. *Nature*. 447: 213-217.
- Campbell, N., Reece, J., Taylor, M., Simon, E., Dickey, J. (2009). *Biology: Concepts & Connections*. 6^{ta} Edición. Pearson – Benjamin Cummings. San Francisco. pp. 781.
- Casamitjana-Martínez, E., Hugo F. Hofhuis, H. F., Xu, J., Liu, C-M., Heidstra, R., & Scheres, B. (2003). Root-Specific *CLE19* Overexpression and the *soll/2* Suppres-

- sors Implicate a CLV-like Pathway in the Control of *Arabidopsis* Root Meristem Maintenance. *Current biology*, 13, 1435-1441.
- Chapman, K., Groot, E., Nichol, S., Rost, T. (2003). Primary root growth and the pattern of root apical meristem organization are coupled. *J Plant Growth Regul.* 21: 287-295.
- Cooper, G. y Hausman, R. (2009). *The Cell: A Molecular Approach*. 5^a Edición. Sinauer Associates. Massachusetts. pp. 820.
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Constantino, P., & Sabatini, S. (2007). Cytokinins determine arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current biology : CB*, 17(8), 678-682.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993). Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*. 119: 71-84.
- Dobrochaev, A.E., & Ivanov, V. B. (2001). Variations in the size of mitotic cells in the root meristem. *Russian Journal of Developmental Biology*, 32(4), 205-214.
- Dubois E, Bercy J, Descamps F, Messenguy F (1987). Characterization of two new genes essential for vegetative growth in *Saccharomyces cerevisiae*: nucleotide sequence determination and chromosome mapping. *Gene*. 55:265-275.
- Esau, K. (1977). *Anatomía de las plantas con semilla*. 2^a Edición. Editorial Hemisferio Sur, Uruguay. pp. 512.
- Evert, R. (2008). *Esau Anatomía Vegetal - Meristemas, células y tejidos de las plantas: Su estructura, function y desarrollo*. 3^{ra} Edición. Ediciones Omega. Wisconsin. pp. 614.
- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R. & Scheres, B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature*, 449 (25), 1053-1057.
- Gramzow, L., Ritz, M. y Theißen, G. (2010). On the origin of MADS-domain transcription factors. *Trends in Genetics*. 26: 149-153.

- Grieneisen, V., Scheres, B., Hogeweg, P. & Marée, A. (2012). Morphogengineering roots: comparing mechanisms of morphogen gradient formation. *BMC Systems Biology*, 6:37.
- Herr, J. M. (1971). A New Clearing-Squash Technique for the Study of Ovule Development in Angiosperms. *American Journal of Botany*, 58(8), 785.
- Ivanov, V.B. (1971). Critical size of the cell and its transition to division. I. Sequence of transition to mitosis for sister cells in the corn seedling root tip. *Sov. J. Dev. Biol.* 2:421-428.
- Ivanov, V.B. (1981). Cellular basis of root growth. *Soviet Scientific Reviews D 2*: 365-392.
- Ivanov, V.B. (1994). Root growth responses to chemicals. *Soviet Scientific Reviews D Physicochem. Biol.* 13: 1–70.
- Ivanov, V.B. (1997). Relationship between cell proliferation and transition to elongation in plant roots. *International Journal of Developmental Biology*. 41: 907-915.
- Malamy, J., & Benfey, P. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*. 124: 33-44.
- Messenguy, F., & Dubois, E. (2003). Role of MADS box proteins and their cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Gene*, 316, 1-21.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Constantino, P., Sabatini, S. (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current Biology*, 20, 1138-1143.
- R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., y Ljung, K. (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *Plant Cell* 21, 1659–1668.

- Rounsley, S. D., Ditta, G. S., & Yanofsky, M. F. (1995). Diverse Roles for MADS Box Genes in Arabidopsis Development. *The Plant Cell*, 7(8), 1259-1269.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev.* 17: 354-358.
- Scheres, B., Wolkenfelt, H., Willemsen, V., Terlouw, M., Lawson, E., Dean, C., & Weisbeek, P. (1994). Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development*, 120(9), 2475-2487.
- Shishkova, S., Rost, T., Dubrovsky, J. (2008). Determinate Root Growth and Meristem Maintenance in Angiosperms. *Annals of Botany*. 101: 319-340.
- Silk, W.K. (1992). Steady form from changing cells. *International Journal of Plant Sciences*. 153: 49-58.
- Stryer, L., Berg, J., Tymoczko, J. (2003). Bioquímica. 5ª Edición. Editorial Reverté. Barcelona. pp. 974.
- Tapia-López, R., García-Ponce, B., Dubrovsky, J. G., Garay-Arroyo, A., Pérez-Ruíz, R. V., Kim, S.-H., Acevedo, F., et al.(2008). An AGAMOUS-Related MADS-Box Gene, XAL1 (AGL12), Regulates Root Meristem Cell Proliferation and Flowering Transition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 146(3), 1182-1192.
- Webster, P.L. (1979). Variation in sister-cell cycle durations and loss of synchrony in cell lineages in root apicalmeristems. *Plant Sci. Lett.* 14: 13-22.
- Webster, P. L., & MacLeod, R. D. (1980). Characteristics of root apical meristem cell population kinetics: a review of analyses and concepts. *Environmental and Experimental Botany*, 20, 334-358.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Grissem, W., Scheres, B. (2005). The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell*. 123: 1337-1349.

Willemsen, V., Wolkenfelt, H., De Vrieze, G., Weisbeek, P. & Scheres, B. (1998). The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development*, 125,521-531.

11. APÉNDICE

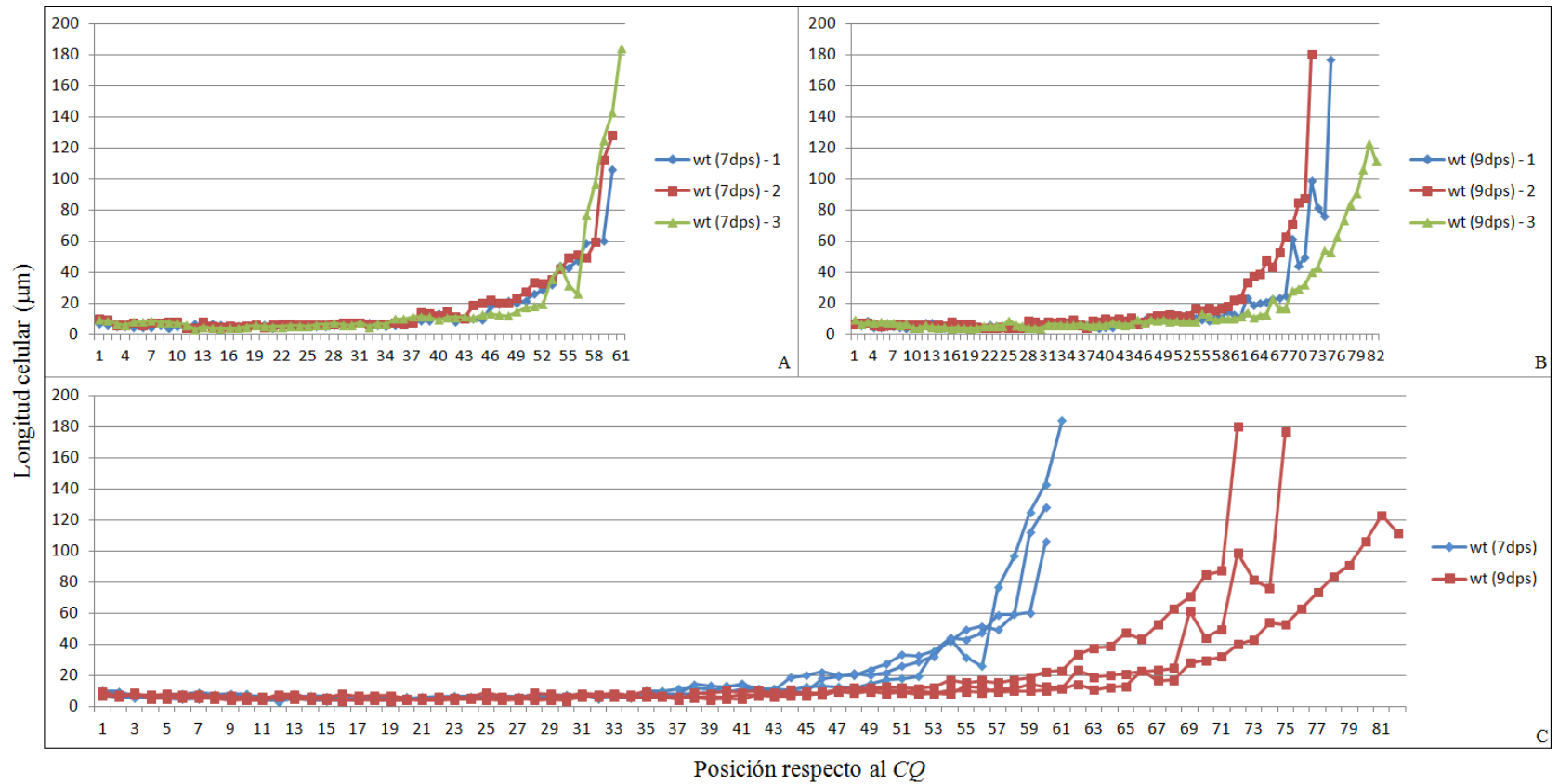


Figura A1. Longitud de las células del meristemo y la ZA expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico, y su posición respecto al CQ en plántulas individuales WT. Donde: A, 7dps. B, 9dps. C, comparación entre plántulas de 7 y 9dps.

Cuadro 1a - Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los tiempos 7 y 9 dps en las plántulas de cada fondo (*WT*, *35S::XAL1* y *xal1-2*) del experimento 1. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	<i>xal1-2</i>			<i>WT</i>			<i>35S::XAL1</i>		
	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)
Longitud de células meristemáticas	0.002	7.5±0.2	8.3±0.2	1	6.8±0.1	6.8±0.1	0.0001	6.9±0.1	6.5±0.1
No. de células en el meristemo	0.2	31.8±1	34.6±1.4	0.01	46.9±1.5	53.2±1.5	0.03	44.5±1.2	53±3.1
Longitud celular máxima en el meristemo	0.05*	15±0.3	15.6±0.7	0.7	12.3±0.7	12.6±0.6	0.2	13±0.7	12.3±0.4

Cuadro 1b – Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los tiempos 7 y 9 dps en las plántulas de cada fondo (*WT*, *35S::XAL1* y *xal1-2*) del experimento 2. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	<i>xal1-2</i>			<i>WT</i>			<i>35S::XAL1</i>		
	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm EE$)	9dps ($\bar{x} \pm EE$)
Longitud promedio de células meristemáticas	0.6	8.2±0.2	8.4±0.2	0.8	7.5±0.1	7.5±0.1	0.06*	7.2±0.1	6.82±0.1
No. de células en el meristemo	0.4	26.6±0.8	28.1±1.3	0.07*	36.1±2	42.5±2.2	0.06*	35.4±1.5	41±2.3
Longitud celular máxima en el meristemo	0.1	13.7±0.8	15.51±0.8	0.8	13.5±0.7	13.6±0.4	0.04	13.5±0.5	12.1±0.5

Cuadro 1c – Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los tiempos 7 y 9 dps en las plántulas de cada fondo (*WT*, *35S::XAL1* y *xall-2*) del experimento 3. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	<i>xall-2</i>			<i>WT</i>			<i>35S::XAL1</i>		
	p-value	7dps ($\bar{x} \pm$ ET)	9dps ($\bar{x} \pm$ ET)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm$ ET)	9dps ($\bar{x} \pm$ ET)	p-value	7dps ($\bar{x} \pm$ ET)	9dps ($\bar{x} \pm$ ET)
Longitud promedio de células meristemáticas	0.004	8 \pm 0.2	8.7 \pm 0.2	0.03	6.7 \pm 0.1	6.9 \pm 0.1	0.3	6.6 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1
No. de células en el meristemo	0.04	28.5 \pm 1.1	32.4 \pm 1.3	0.03	49.6 \pm 1.7	56.5 \pm 2	0.06*	49.8 \pm 1.8	57.4 \pm 2.8
Longitud celular máxima en el meristemo	0.1051	13.8 \pm 0.7	15.3 \pm 0.6	0.4	13.4 \pm 0.5	13.1 \pm 0.4	1	12.6 \pm 0.3	12.9 \pm 0.8

Cuadro 2a –Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los fondos *WT*, *35S::XAL1* y *xall-2* en cada tiempo (7 y 9 dps) del experimento 1. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	7dps				9dps			
	p-value	<i>xall-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	p-value	<i>xall-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)
Longitud promedio de células meristemáticas	0.0009	7.5 \pm 0.2	6.8 \pm 0.1	6.9 \pm 0.1	2.2e-16	8.3 \pm 0.2	6.8 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1
No. de células en el meristemo	5.017e-05	31.8 \pm 1	46.9 \pm 1.5	44.5 \pm 1.2	0.0001	34.6 \pm 1.4	53.2 \pm 1.5	53 \pm 3.1
Longitud celular máxima en el meristemo	0.001	15 \pm 0.3	12.3 \pm 0.71	13 \pm 0.7	0.002	15.6 \pm 0.7	12.6 \pm 0.6	12.3 \pm 0.4

Cuadro 2b – Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los fondos *WT*, *35S::XAL1* y *xal1-2* en cada tiempo (7 y 9 dps) del experimento 2. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	7dps				9dps			
	p-value	<i>xal1-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	p-value	<i>xal1-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)
Longitud promedio de células meristemáticas	3.782e-09	8.2±0.2	7.5±0.1	7.2±0.1	3.819e-12	8.4±0.2	7.5±0.1	6.8±0.1
No. de células en el meristemo	1.062e-05	26.6±0.8	36.1±2	35.4±1.5	0.0003	28.1±1.3	42.5±2.2	41±2.3
Longitud celular máxima en el meristemo	0.9	13.7±0.8	13.5±0.7	13.5±0.5	0.005	15.5±0.8	13.6±0.4	12.1±0.5

Cuadro 2c – Análisis morfométrico del meristemo apical de la raíz haciendo una comparación entre los fondos *WT*, *35S::XAL1* y *xal1-2* en cada tiempo (7 y 9 dps) del experimento 1. Media (\bar{x}) y error típico (EE), ($n=10$).

Parámetros	7dps				9dps			
	p-value	<i>xal1-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	p-value	<i>xal1-2</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>WT</i> ($\bar{x} \pm$ ET)	<i>35S::XAL1</i> ($\bar{x} \pm$ ET)
Longitud promedio de células meristemáticas	< 2.2e-16	8±0.2	6.7±0.1	6.6±0.1	< 2.2e-16	8.7±0.2	6.9±0.1	6.6±0.1
No. de células en el meristemo	5.856e-05	28.5±1.1	49.6±1.7	49.8±1.8	6.064e-05	32.4±1.3	56.5±2	57.4±2.8
Longitud celular máxima en el meristemo	0.2	13.8±0.7	13.4±0.5	12.6±0.3	0.02	15.3±0.6	13.1±0.4	12.9±0.8

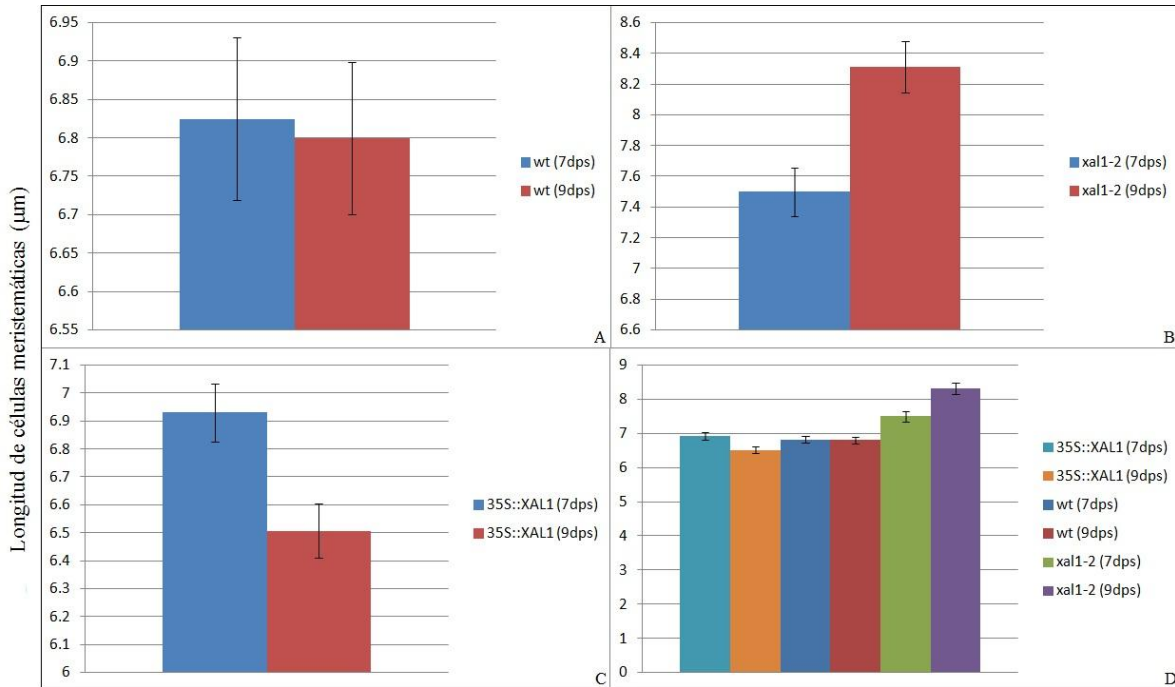


Figura A2. Longitud de células meristemáticas expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 1, donde la significancia fue de: A, $p>0.05$. B, $p<0.005$. C, $p<0.0005$. D, Entre los fondos WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* a 7dps ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<0.005$ y de 9dps fue de $p<2.2 \times 10^{-16}$.

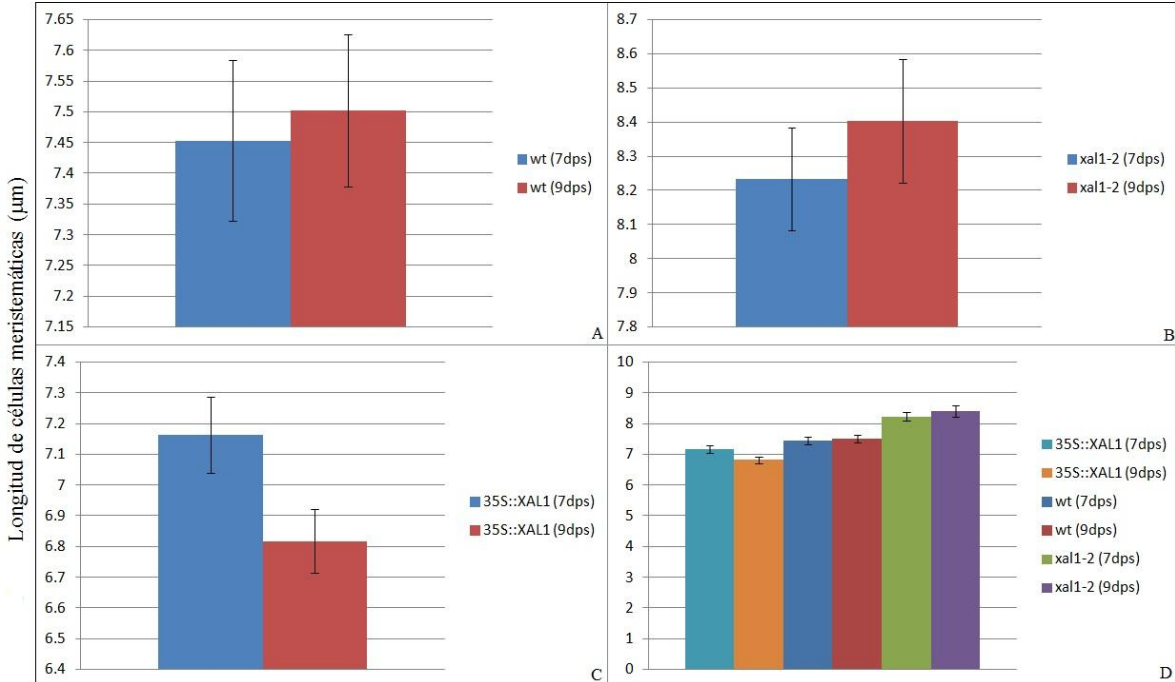


Figura A3. Longitud de células meristemáticas expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 2, donde la significancia fue de: A, $p>0.05$. B, $p>0.05$. C, $p<0.06$. D, Entre los fondos WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* a 7dps ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<4 \times 10^{-9}$ y de 9dps fue de $p<4 \times 10^{-12}$.

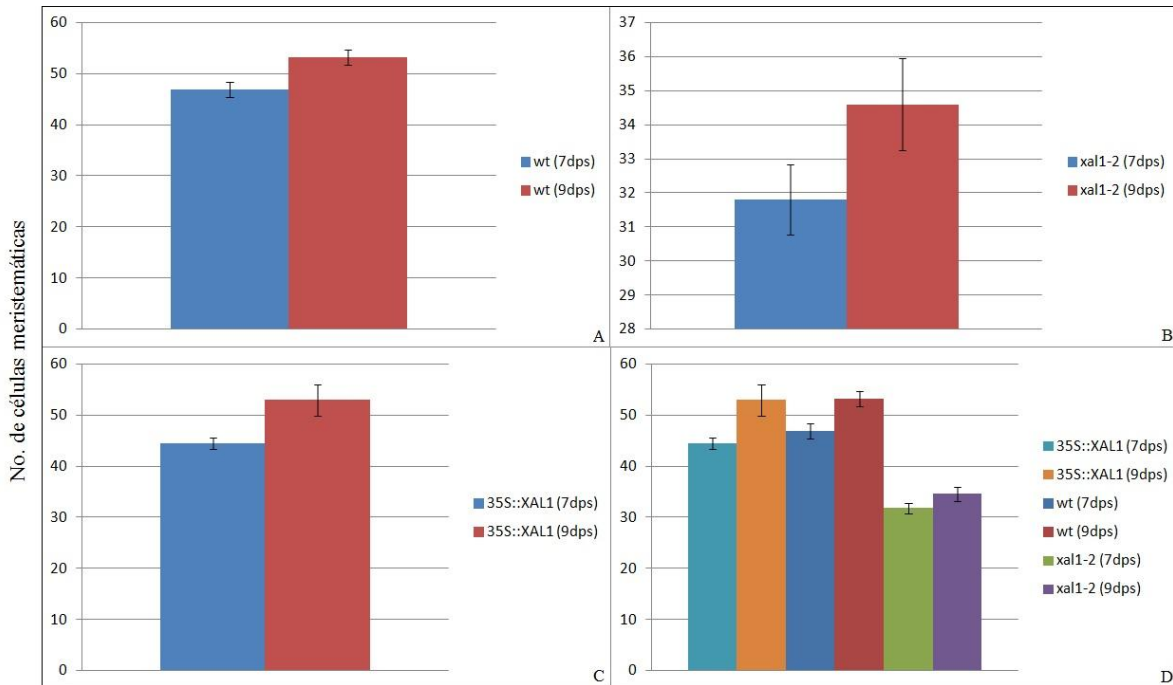


Figura A4. Número de células en el meristemo expresado como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 1, donde la significancia fue de: A, $p<0.05$. B, $p>0.05$. C, $p<0.05$. D, Entre los fondos *WT*, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<5 \times 10^{-5}$, y en 9dps de $p<0.0005$.

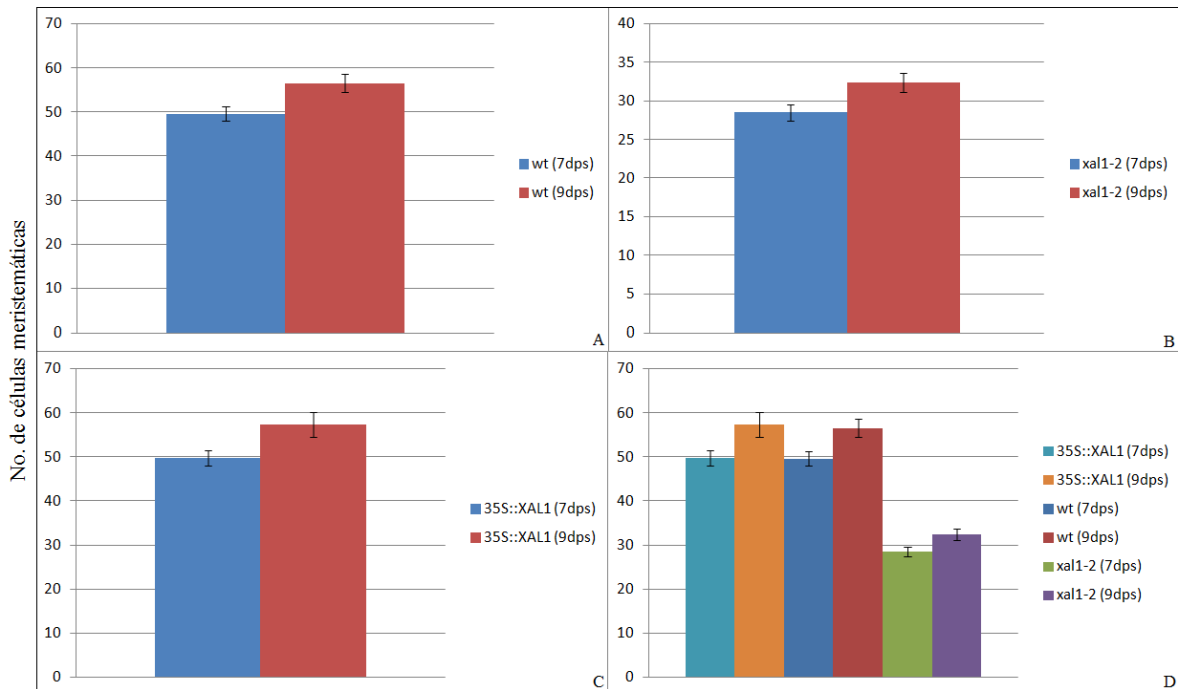


Figura A5. Número de células en el meristemo expresado como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 3, donde la significancia fue de: A, $p<0.05$. B, $p<0.05$. C, $p<0.06$. D, Entre los fondos *WT*, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<0.0001$, y en 9dps de $p<0.0001$.

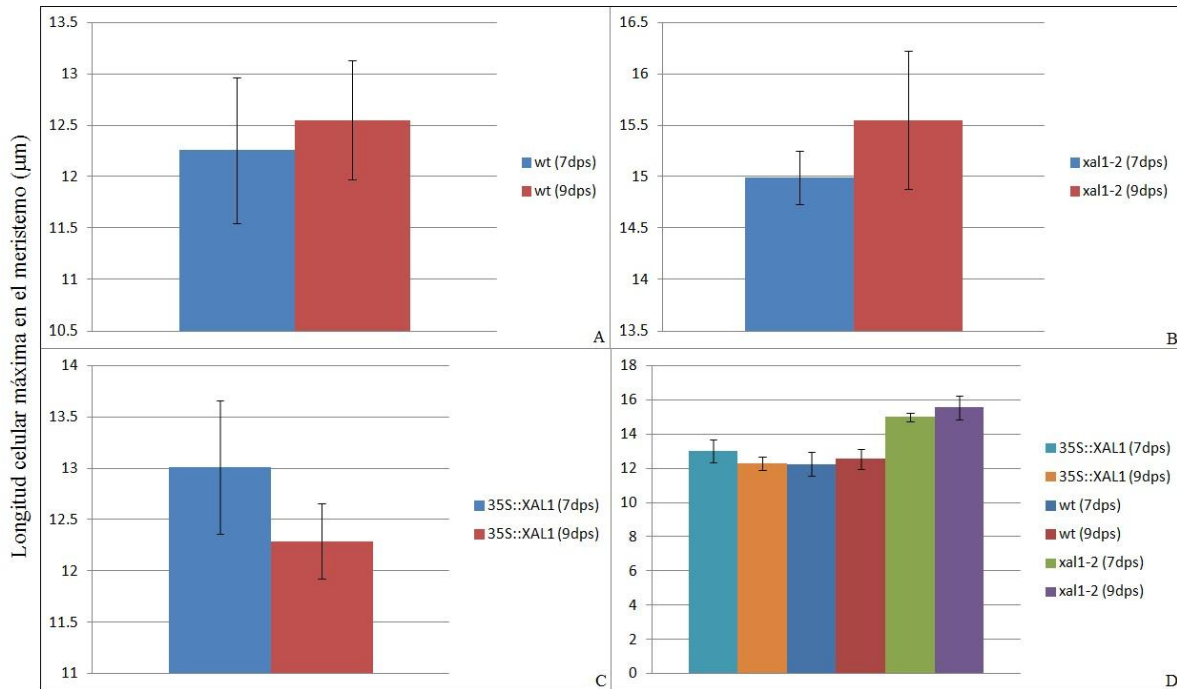


Figura A6. Longitud celular máxima en el meristemo expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 1, donde la significancia fue de: A, $p=0.05$. B, $p>0.05$. C, $p>0.05$. D, Entre los fondos WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p<0.005$, y en 9dps de $p<0.005$.

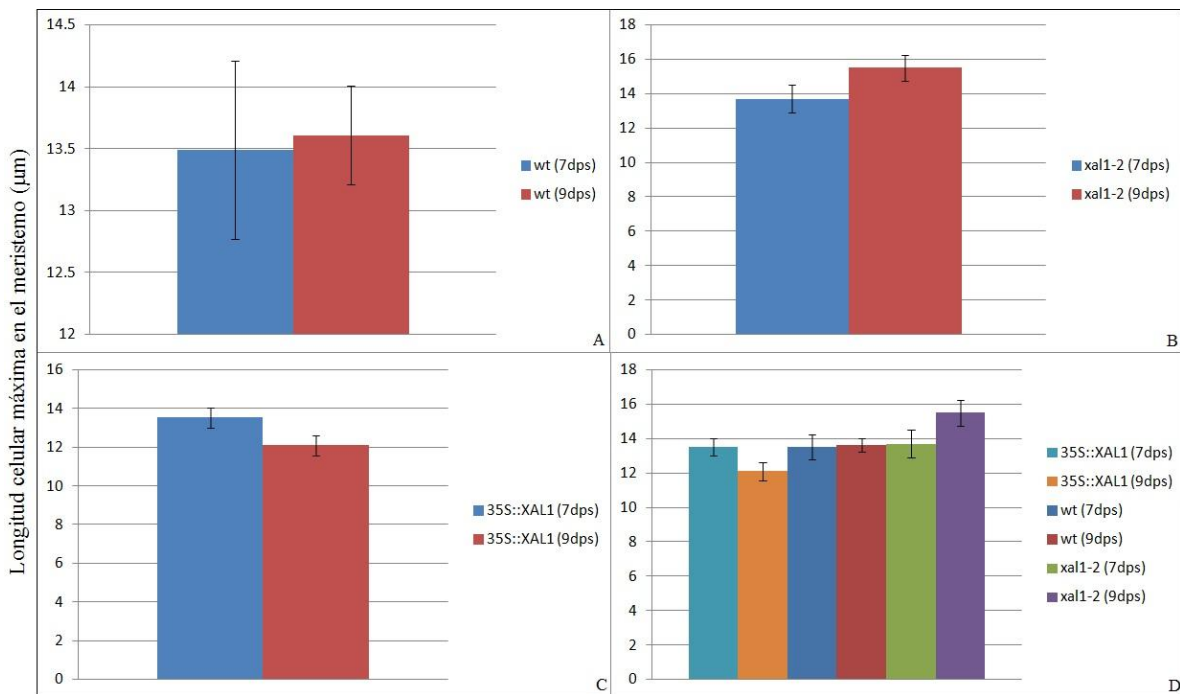


Figura A7. Longitud celular máxima en el meristemo expresada como la media en $\mu\text{m} \pm$ el error típico a 7 y 9dps ($n=10$) en el Experimento 2, donde la significancia fue de: A, $p>0.05$. B, $p>0.05$. C, $p<0.05$. D, Entre los fondos WT, *xal1-2* y *35S::XAL1* ($n=10$), donde la significancia para 7dps fue de $p>0.05$, y en 9dps de $p<0.05$.